

Fluorogene native chemische Peptidverknüpfung

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Im Fach Chemie

Eingereicht in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von Diplom Chemiker Henrik Petszulat

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematischen Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Seitz
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Hackenberger
3. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Schwarzer

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2021

ABSTRACT

In this thesis a new template-controlled fluorogenic peptide linkage was presented. Specially modified peptide fragments were enabled to undergo a chemical reaction by binding to a template molecule, which resulted in a fluorescent signal. This allowed a reaction control in real time. The fluorogenic peptide linkage was successfully established using a coiled coil peptide model. Peptide thioesters were modified in such a way that a fluorophore was placed in close proximity to the thioester group and the acetylated mercapto group acted as fluorescence quencher. These modified thioesters can react with N-terminal cysteinyl peptides according to the reaction mechanism of the native chemical ligation (NCL) under the formation of an peptide bond. The fluorescence-quenching mercapto group leaves the peptide thioester as a leaving group, resulting in a fluorescent reaction product. Template-controlled execution of this fluorogenic native chemical ligation (fNCL) allowed the reaction to be performed at very low peptide concentrations. The synthesis of the required fluorogenic thioesters was achieved on the one hand by applying a self-purifying thioester synthesis with a tandem-protective coupling strategy and on the other hand by using a synthesized fluorogenic azide thioester building block which was reacted with an alkyne-modified peptide.

In addition to the coiled coil peptides, double-stranded DNA and antibodies were used as templates for fNCL. Finally, the fNCL could be used to perform a distance screening. A dependence between the reaction rate and the distance between the binding sites in the template for two reactive peptide binding partners was shown. By this investigation a distance between two binding sites in a template molecule could be determined, which does not show a template effect anymore.

KURZZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde eine neue Templat-gesteuerte fluorogene Peptidverknüpfung vorgestellt. Speziell modifizierte Peptidfragmente wurden durch die Bindung an ein Templatmolekül zu einer chemischen Reaktion befähigt, wodurch ein Fluoreszenzsignal erzeugt werden konnte. Dies erlaubte eine Reaktionskontrolle in Echtzeit. Die fluorogene Peptidverknüpfung konnte erfolgreich mit einem Coiled-coil Peptid-Model etabliert werden. Dabei wurden Peptidthioester derart modifiziert, dass in räumlicher Nähe zur Thioestergruppe ein Fluorophor platziert wurde und die acetylierte Mercaptogruppe als Fluoreszenzlöcher agierte. Diese modifizierten Thioester können nach dem Reaktionsmechanismus der nativen chemischen Peptidverknüpfung (NCL) unter der Bildung einer Amidbindung mit *N*-terminalen Cysteinylopeptiden reagieren. Die fluoreszenzlöschende Mercaptogruppe verlässt dabei den Peptidthioester als Nukleofug, wodurch ein fluoreszierendes Reaktionsprodukt entsteht. Die Templat-gesteuerte Durchführung dieser fluorogenen nativen chemischen Peptidverknüpfung (fNCL) erlaubte die Reaktionsdurchführung bei sehr geringen Peptidkonzentrationen. Die Synthese der benötigten fluorogenen Thioester gelang zum einem durch die Anwendung der selbstreinigenden Thioestersynthese mit einer Tandem-Entschützungs-Kupplungs-Strategie und zum Anderen mit Hilfe eines synthetisierten fluorogenen Azid-Thioesterbausteins, welches mit einem Alkin-modifizierten Peptid zur Reaktion gebracht wurde.

Neben Coiled-coil Peptiden, wurden auch doppelsträngige DNA und Antikörper als Template für die fNCL eingesetzt. Abschließend konnte die fNCL zur Durchführung eines Abstandsscreening angewendet werden. Dabei wurde eine Abhängigkeit zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und dem Abstand der Bindungsstellen im Templat für zwei reaktive Peptidbindungspartner gezeigt. Durch diese Untersuchung konnte die räumliche Abstandsgrenze zwischen zwei Bindungsstellen in einem Templatmolekül bestimmt werden, die keinen Templat-Effekt mehr beobachten lässt.

Die experimentellen Arbeiten wurden im Zeitraum von Februar 2012 bis Dezember 2016 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut (Fachbereich: Organische Chemie und Bioorganische Chemie) der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

INHALT

1	EINLEITUNG	1
2	STAND DER FORSCHUNG	3
2.1	Proteinmarkierung zur Detektion von Zielproteinen	3
2.1.1	Proteinnachweis mit Antikörpern	3
2.1.2	Proteinnachweis durch Fluoreszenzbildgebung	5
2.2	Der Templat-Effekt	11
2.2.1	Nukleinsäure gesteuerte organische Synthese	11
2.2.2	Peptid- und Proteingesteuerte organische Reaktionen	14
2.2.3	Protein-gesteuerte Fragmentverknüpfung in der Wirkstoffforschung	20
2.3	Fluorogene Reaktionen	22
2.3.1	Bioorthogonale fluorogene chemische Reaktionen	22
2.3.1.1	CuAAC	22
2.3.1.2	Staudinger-Ligation	24
2.3.1.3	Native chemische Peptidverknüpfung (NCL)	26
2.3.1.4	weitere bioorthogonale Verknüpfungsreaktionen	29
3	ZIELSTELLUNG	32
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	34
4.1	Fluorogene Staudinger Ligation	34
4.2	Vorarbeiten zur Fluorogenen Nativen Chemischen Peptidverknüpfung	45
4.2.1	Modellsystem für die fluorogene NCL	45
4.2.2	Synthese eines fluoreszenzlöschenden Thiols	48
4.3	Weiterführung und Anwendung der fluorogenen nativen chemischen Ligation	49
4.3.1	Synthese eines fluorogenen Thioesters	49
4.3.2	Durchführung der fluorogenen nativen Peptidverknüpfung (fNCL)	54
4.4	Doppelsträngige DNA Template für die fNCL	57
4.5	Antikörper als Templat für die fNCL	75
4.5.1	Durchführung der Antikörper-Templat vermittelten NCL/fNCL	76
4.6	Abstandsscreening mit Hilfe der fNCL	88
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	93
5.1	Zusammenfassung	93
5.1.1	Fluorogene Staudinger-Ligation	93
5.1.2	Fluorogene native chemische Peptidverknüpfung	94

5.1.2.1	Einführung der Nativen chemischen Peptidverknüpfung (NCL) als Modellsystem für eine fluorogene Peptidverknüpfung	94
5.1.2.2	Die Verwendung von doppelsträngiger DNA als Templat in einer Templat-gesteuerten nativen chemischen Peptidverknüpfung	96
5.1.2.3	Antikörper als Templat für die NCL	98
5.1.2.4	Abstandsscening	100
5.2	Ausblick	102
6	EXPERIMENTELLER TEIL	103
6.1	Messgeräte und Hilfsmittel	103
6.1.1	Chemikalien	103
6.1.2	Festphasenpeptidsynthese	103
6.1.3	MALDI/TOF-Massenspektrometrie	103
6.1.4	Analytische HPLC:	104
6.1.5	Analytische HPLC-MS	104
6.1.6	Analytische UPLC-MS	104
6.1.7	Präparative und semipräparative HPLC	105
6.1.8	Photometer	105
6.1.9	UV-spektroskopische Bestimmung der Kupplungsausbeuten bzw. des Beladungsgrads (Fmoc-Monitoring)	105
6.1.10	Konzentrationsbestimmung der Peptid-Stammlösungen	105
6.1.11	NMR-Spektroskopie	106
6.1.12	Dünnschichtchromatographie	107
6.1.13	Säulenchromatographie	107
6.1.14	Fluoreszenzspektroskopie	107
6.2	Manuelle Peptidsynthese	107
6.2.1	Manuelle Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie	107
6.2.1.1	Testabspaltung vom polymeren Träger	108
6.2.1.2	Fmoc-Testabspaltung	109
6.2.2	Synthese von Peptidthioestern nach der Boc-Strategie	109
6.3	Automatisierte Festphasenpeptidsynthese	110
6.4	Selbstreinigende Peptidthioestersynthese	110
6.5	Darstellung der fluorogenen Jun- und Fos-Peptide	113
6.5.1	Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von JunCTTE und FosCTTE	114
6.6	Ligationsreaktionen	115
6.6.1	Staudinger-Ligation	115
6.6.2	Natürliche chemische Peptidverknüpfung	116
6.6.3	Fluorogene native chemische Peptidverknüpfung	116
6.6.4	Ligationsreaktionen mit DNA als Templatmolekül	117
6.6.5	Ligationsreaktionen mit Antikörper als Templatmolekül	118
6.6.5.1	Nichtfluorogene Ligationsreaktion auf Antikörpern	118
6.6.5.2	fluorogene Ligationsreaktion mit Antikörpern als Templatmolekül	119
6.6.5.3	Stabilität des ANTI-FLAG Antikörpers gegenüber TCEP	120
6.7	Chemische Synthese	121
6.7.1	Verbindung 112:	121
6.7.2	Verbindung HSQ:	122
6.7.3	N α -(tert-Butoxycarbonyl)-L-Lysin:	123
6.7.4	Verbindung 120:	124
6.7.5	Verbindung 121:	125

6.7.6	Verbindung 122:.....	126
6.7.7	Verbindung 123:.....	127
6.8	Zusätzliche Ligationsreaktion aus Abschnitt 4.5.1	128
6.8.1	129a+131a.....	128
6.8.2	129b+131a.....	128
6.8.3	129c+131a.....	129
6.8.4	129d+131a.....	129
6.8.5	129a+131b.....	130
6.8.6	129b+131b.....	130
6.8.7	129c+131b.....	131
6.8.8	129d+131b.....	131
6.9	Charakterisierung der Peptide	132
6.9.1	Peptide aus Abschnitt 4.1	132
6.9.1.1	Peptid 87.....	132
6.9.1.2	Peptid 99.....	133
6.9.1.3	Peptid 88.....	134
6.9.2	Peptide aus Abschnitt 4.2 und 4.3	135
6.9.2.1	Peptid 106.....	135
6.9.2.2	Peptid 109.....	136
6.9.2.3	Peptid 107.....	137
6.9.3	Peptide aus Abschnitt 4.4	138
6.9.3.1	Peptid JunCTCys	138
6.9.3.2	Peptid FosCTCys	140
6.9.3.3	Peptid JunCTTE	142
6.9.3.4	Peptid FosCTTE	144
6.9.4	Peptide aus Abschnitt 4.5	146
6.9.4.1	Peptid 124.....	146
6.9.4.2	Peptid 125.....	147
6.9.4.3	Peptid 126.....	148
6.9.4.4	Peptid 131a	149
6.9.4.5	Peptid 131b.....	150
6.9.4.6	Peptid 132.....	151
6.9.4.7	Peptid 129a	152
6.9.4.8	Peptid 129b.....	153
6.9.4.9	Peptid 129c	154
6.9.4.10	Peptid 129d	155
6.9.4.11	Peptid 130a.....	156
6.9.4.12	Peptid 130b	157
6.9.4.13	Peptid 130c.....	158
6.9.4.14	Peptid 130d	159
6.9.5	Peptide aus Abschnitt 4.6	160
6.9.5.1	Peptid 134a	160
6.9.5.2	Peptid 134b.....	161
6.9.5.3	Peptid 134c	162
6.9.5.4	Peptid 133a	163
6.9.5.5	Peptid 133b.....	163
6.9.5.6	Peptid 133c	164
6.9.5.7	Peptid 135a	164
6.9.5.8	Peptid 135b.....	165
6.9.5.9	Peptid 135c	165
7	SPEKTROSKOPISCHER ANHANG	166

8	LITERATURVERZEICHNIS.....	174
9	DANKSAGUNG.....	186

1 Einleitung

Die vollständige Entschlüsselung des Genoms^{1,2} wurde von einer vielleicht sogar noch herausfordernden Aufgabe abgelöst: Die Charakterisierung des menschlichen Proteoms.³ Das Proteom bezeichnet die Gesamtheit der (exprimierten) Proteine, die durch das Genom einer Zelle oder eines Organismus kodiert werden. Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom eine äußerst dynamische Größe.

Proteine erfüllen in der Zelle Aufgaben wie u.a. die Regulierung des Zellzyklus⁴⁻⁶, Signal-Transduktion⁷⁻⁹, DNA-Replikation^{10,11} oder Zellproliferation.^{12,13}

Darüber hinaus sind Proteine als Biomarker messbare Indikatoren für den konkreten biologischen Zustand der Zelle sowie die Anwesenheit oder das Stadium einer Krankheit.¹⁴ So können Biomarker für die Diagnose und die Überwachung der Aktivität von Krankheiten verwendet werden. Die Weltgesundheitsorganisation stellte fest, dass Millionen von Krebspatienten vom vorzeitigen Tod verschont bleiben könnten, wenn eine Früherkennung und effiziente Behandlungsmethoden zur Verfügung stünden.¹⁵ Eine wichtige Anwendung von spezifischen Biomarkern ist die Entdeckung von Tumoren¹⁶ in einem sehr frühen Stadium, in dem diese noch lokalisiert sind und möglicherweise noch keine klinischen Symptome entwickeln konnten.¹⁷ Außerdem können Biomarker verwendet werden, um den Krebstyp genauer bestimmen zu können. Eine personalisierte Therapie ist möglich, wenn eine möglichst genaues Bild über die Krebsart sowie seine Individualität bekannt ist, Biomarker wurden dafür schon erfolgreich eingesetzt.

Um die Struktur, Interaktionen und Funktionen aller Proteine in einer Zelle zu identifizieren werden unterschiedliche Messmethoden wie zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese¹⁸⁻²¹, Massenspektrometrie²²⁻²⁶, ELISA²⁷, Protein-Mikroarrays²⁸⁻³², Antikörper-Mikroassays³³⁻³⁵ und Proteinbioinformatik^{36,37} genutzt und kombiniert. Es wäre wünschenswert eine Technik äquivalent zur DNA-Vervielfältigung und Detektion mittels Polymerasekettenreaktion zur Verstärkung von Proteinen verwenden zu können. Dafür müssten Techniken entwickelt werden, welche die Detektion von einem bis mehreren Millionen Molekülen pro Zelle ermöglichen.

Prozesse der Separation und Analyse von Proteinen sind sehr aufwendig für den Operator und bleiben weiterhin schwierig zu automatisieren.^{38,39}

Was ist also ein gutes Diagnosewerkzeug oder eine gute Sonde für die oben beschriebenen Biomarker? Ein solches Werkzeug muss ein flexibler, beliebig erweiterbarer und empfindlicher Sensor für Proteine als Biomarker sein. Eine solche Sonde sollte es ermöglichen, Proteine in aufgeschlossenen Zellen oder gar in der lebenden Zelle nachzuweisen, ohne das Proteom dieser Zelle aufwendig auftrennen zu müssen. Ein solche „One-Pot“-Lösung würde u.a. Schnelltests oder Live-Cell-Imaging ermöglichen. Der Nachweis der Proteine kann hier durch die Erzeugung eines Fluoreszenzsignals bei der Anwesenheit des nachzuweisenden Proteins erbracht werden. So könnten Nachweiszeiten von Proteinen im Vergleich zu herkömmlichen HPLC-MS/MS-Methoden verkürzt werden. Das Entwickeln einer solchen chemischen Methode ist das Ziel dieser Arbeit.

2 Stand der Forschung

2.1 Proteinmarkierung zur Detektion von Zielproteinen

2.1.1 Proteinnachweis mit Antikörpern

Die hochspezifische Bindung von Antikörpern an Epitope eines Antigens macht Antikörper zu einem unverzichtbaren Werkzeug zum Nachweis von Proteinen. Ein Antigen besteht aus unterschiedlichen Epitopen. Diese können durch das Schlüssel-Schloss-Prinzip sehr spezifisch gebunden werden (Abbildung 1 A). Aufgrund dieser Eigenschaft finden Antikörper vielfältige Anwendung bei der Diagnose und Therapie⁴⁰⁻⁴³ von Krankheiten, vielmehr aber noch in der Forschung. Die Technologie zur Markierung von Antikörpern mit fluoreszierenden Molekülen oder Enzymen existiert seit bereits 70 Jahren und wird fortwährend weiterentwickelt (Abbildung 1 B).⁴⁴⁻⁴⁸

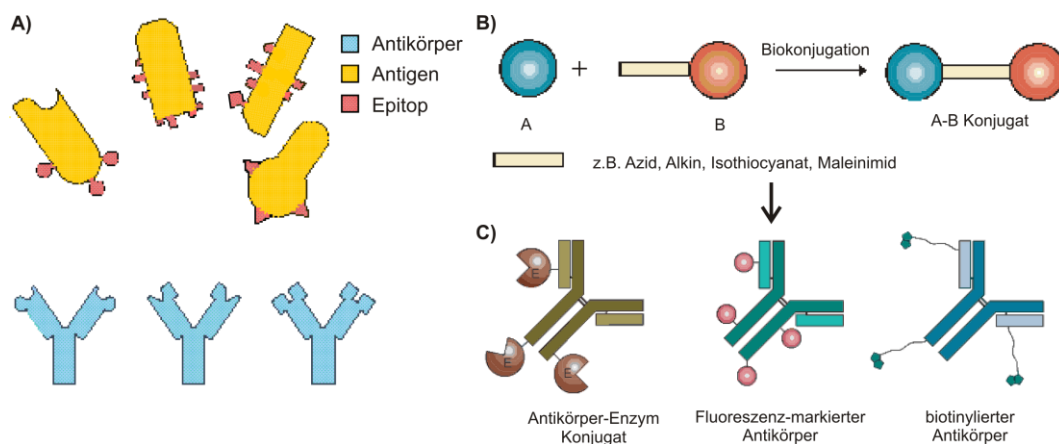


Abbildung 1: A) Vereinfachte Darstellung von Antikörpern und Antigenen. Antikörper können passende Antigene hochspezifisch am entsprechenden Epitop binden. B) Biokonjugation zwischen einem biologischen Molekül (z. B. Antikörper A) und einer Markierung B mit Hilfe eines Biokonjugationsreagenz (Rechteck) oder reaktiven Gruppen wie z. B. Aziden, Alkinen, Isothiocyanaten oder Maleinimiden. C) Antikörper-Enzym Konjugate, fluoreszenzmarkierte Antikörper oder Biotin-markierte Antikörper sind die gebräuchlichsten Konstrukte zum Nachweis von Antigenen in Assays.

Neben der Proteinimmunoprecipitation⁴⁹⁻⁵¹, dem Western Blot^{52,53} (Abbildung 2 B), der Immunhistochemie⁵⁴⁻⁵⁶ (Abbildung 2 A) oder der Fluoreszenz-aktivierter Fluss-Sortierung (FACS, Abbildung 2 C) von Zellen ist der ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) die wohl wichtigste Methode zum Nachweis von Proteinen mit Antikörpern.

Der ELISA ist ein qualitativer und quantitativer Test, welcher Antikörper zur Bindung und Bestimmung eines Zielmoleküls verwendet. Zur Bestimmung der Analyten können

sowohl monoklonale, als auch polyklonale Antikörper benutzt werden. Bei den Analyten handelt es sich meist um Peptide, Proteine, Antikörper oder kleine Moleküle. Die hohe Spezifität der Antikörper macht den ELISA so effizient. Die direkte und indirekte Verknüpfung eines Enzymtests mit dem Antikörper erlaubt den Nachweis des Analyten durch eine Enzym-vermittelte Signalverstärkung. Am häufigsten werden Peroxidasen und alkalische Phosphatasen als Enzyme verwendet.

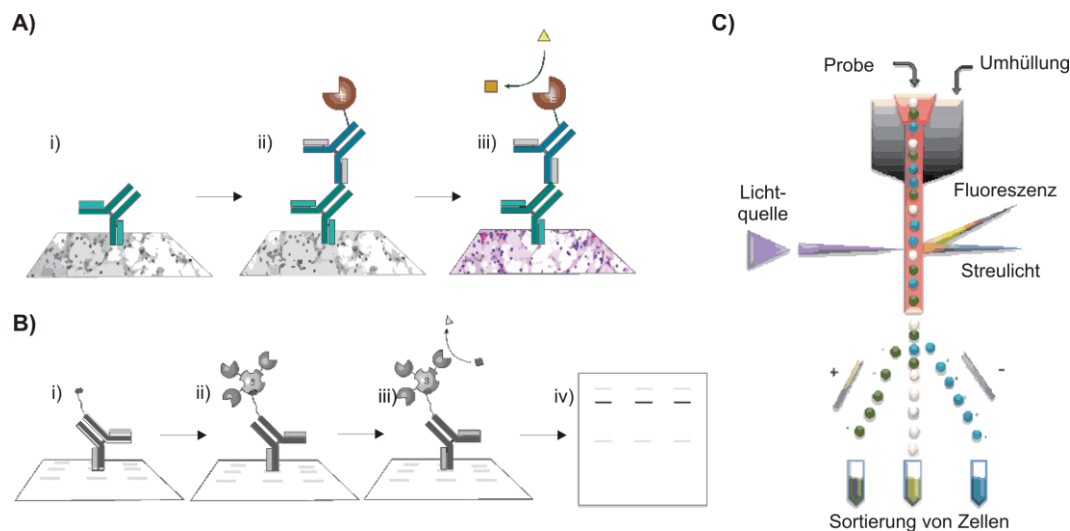


Abbildung 2: **A)** Immunhistochemische Anfärbung von Geweben mit Hilfe von Antikörpern i) der primäre Antikörper bindet am Zielprotein in einer Gewebeprobe. ii) Ein sekundärer Enzym-modifizierter Antikörper bindet den primären Antikörper. iii) Die Substratreaktion erzeugt eine unlösliche Färbung an der Stelle, wo sich das Zielprotein befindet. **B)** Western-Blot: Über eine Membran werden die Banden aus einem SDS Polyacrylamidgel auf Nitrocellulose übertragen. i) Biotin-markierte primäre Antikörper werden auf die Nitrocellulose aufgetragen. ii) Ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat bindet am Biotin des primären Antikörpers. iii) Das Substrat produziert ein detektierbares Signal. iv) Die gewünschte Proteinbande wurde detektiert. **C)** Aufbau eines FACS-Experiments (Fluoreszenz-aktivierter Fluss-Sortierung).

Methodisch lässt sich der ELISA in den direkten⁵⁷⁻⁵⁹, den indirekten⁶⁰, den Sandwich⁶¹- und den Kompetitions- oder Inhibitions-ELISA⁶² unterteilen.

Aufgrund der einfachen Handhabung, dem günstigen Preis, der einfachen Detektion, der Zugänglichkeit und Spezifität wird der ELISA in der Detektion von z.B. Krebs-Proteinmarkern, Pathogenen und anderen krankheitsverwandten Proteinen, aber auch in der Lebensmittelüberwachung, angewendet.^{57,63-67}

Weiterhin kombinieren Fluoreszenz-basierte Immunoassays, wie der FLISA (Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay) einfache Immunosorbent Assays mit Fluoreszenz-Reportern. Anstatt einem enzymatischen Reporter, verwendet der FLISA Antikörper-Konjugate mit Fluoreszenzfarbstoffen. Da weniger Antikörper als im ELISA benötigt werden finden FLISAs bei Hochdurchsatzverfahren Anwendung.

Das Detektionslimit liegt hier in einem Bereich von 0.1 ng bis 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.^{57,68} Demnach ist die Empfindlichkeit des konventionellen ELISA zu gering, um Biomarker in sehr geringen Konzentrationen, die bei einigen Krankheiten in frühen Stadien vorkommen, nachzuweisen.^{69,70} Die Tatsache, dass eine frühe Diagnose einer Krankheit helfen kann die therapeutische Intervention zu verbessern, fordert eine ultrasensitive Detektionsmethode für Biomarker im ELISA.⁷¹ Aus den beschriebenen kolorimetrischen ELISA ging ein ELISA hervor, welcher mit Hilfe der Fluorometrie ausgewertet werden konnte. Diese Fluoreszenz-basierten ELISAs weisen eine viel höhere Sensitivität auf.⁷²

Zur Zeit sind Fluoreszenz-basierte Immunoassays eine der sensitivsten Analysemethoden zur Untersuchung von Biomarkern. Die Kombination von ELISA und Fluoreszenzimmunoassay wird als FELISA bezeichnet. In den vergangenen Dekaden wurde der FELISA auf Grundlage des Meerrettich-Peroxidase-basierten (HRP) Chemolumineszenzimmunoassay, des alkalische Phosphatase (ALP) Chemolumineszenzimmunoassay oder anderen Lumineszenz-Enzym-Immunoassays entwickelt. Statt einer sichtbaren Farbreaktion, erzeugt die enzymatische Reaktion ein im FELISA ein fluoreszierendes Reaktionsprodukt. Die Verwendung unterschiedlicher Enzyme in Kombination mit Edelmetall-Nanopartikeln kann die Empfindlichkeit des FELISA stark erhöht werden oder Fluoreszenzsignale im sichtbaren Bereich erzeugt werden.^{73,74} Die Entwicklung multiplexer Immunoassays erlaubt die Untersuchung mehrerer Analyten zur gleichen Zeit.²⁷ So konnten Szarka zeigen, dass ein paralleler Nachweis von 16 Biomarkern problemlos möglich ist.⁷⁵

2.1.2 Proteinnachweis durch Fluoreszenzbildgebung

Die Fluoreszenzbildgebung ist ein unverzichtbares Werkzeug für Untersuchungen in der Zell- und Molekularbiologie geworden. Das grüne fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) und GFP-artig fluoreszierende Proteine haben die Fluoreszenzmikroskopie revolutioniert.⁷⁶ Die Möglichkeit, Zielproteine (protein of interest, POI) genetisch zu markieren, hilft Forschern heute dabei die subzelluläre räumliche Anordnung, den zeitlichen Verlauf und Größenordnungen vieler zellulärer Mechanismen zu verstehen. Dabei wurde im Laufe der Zeit nicht nur die Farbpalette fluoreszenter Proteine erweitert, um unterschiedliche POIs simultan zu detektieren^{77,78}, sondern auch photoaktivierbare fluoreszente Proteine wurden entwickelt, um die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie voranzutreiben.⁷⁹ Dennoch haben

autofluoreszente Proteine wie GFP oder mCherry auch Nachteile.^{80,81} Ihre Chromophore bilden sich durch Zyklisierung, Dehydration und schließlich Oxidation eines Aminosäuretriplets (Ser-Tyr-Gly in GFP). Daraus ergibt sich eine relativ langsame Bildung des Fluorophors (maturation time). Das grün fluoreszierende Protein besteht aus einem rigiden und relativ großem (ca. 26 kDa) β -Fass, welches die korrekte Anordnung,⁸² Faltung⁸³ oder die Funktion vieler Proteine behindert. Zusätzlich setzt diese die Anwesenheit von Sauerstoff voraus. Die Entstehung von Wasserstoffperoxid bei der Bildung des Fluorophors in GFP-artigen Proteinen kann in vivo Experimenten zu Problemen führen. Wasserstoffperoxid ist ein bekannter Mediator des Zellüberlebens, Wachstums, der Differentiation und der daraus hervorgehenden Krankheiten.^{76,84-87}

Um diese Hürden zu umgehen, wurden Alternativen entwickelt, welche das Prinzip der oben beschriebenen Proteinmarkierung beibehalten, aber einen externen Chromophor verwenden. Diese Systeme basieren entweder auf der Anwesenheit natürlicher Fluorophore in der Zelle oder sind abhängig von synthetischen Fluorophoren im Zellkulturmedium.^{88,89}

Systeme, welche auf der Anwendung endogener Chromophore aus der Zelle basieren, sind Abhängig von der Anwesenheit von, Flavinmononukleotid (FMN), Biliverdin oder Bilirubin. Systeme die auf der Komplexierung von FMN beruhen, sind typischerweise nicht-kovalente Komplexe welche im cyan-grünen Bereich fluoreszieren.^{90,91} Zur Zeit gibt es nur ein Protein, welches Bilirubin als Chromophor bindet.⁹² Der nicht-kovalente Komplex emittiert im grünen Wellenlängenbereich. Eine Vielzahl von Systemen mit Biliverdin als Chromophor wurden entwickelt, um im roten und infraroten Wellenlängenbereich zu emittieren.⁹³⁻⁹⁹

Sogenannte selbst-markierende Systeme reagieren mit bestimmten Substraten, welche einen Aminosäurerest im Fusionsprotein irreversibel markieren. Die bekanntesten Systeme sind SNAP-Tag/CLIP-Tag und Halo-Tag. SNAP-Tag ist ein 20 kDa schweres Protein, welches sich von O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase ableitet. Es kann die funktionalisierte Benzylgruppe von O⁶-Benzylguaninderivaten auf ein im aktiven Zentrum vorhandenes Cystein übertragen (Abbildung 3 A).^{100,101} Der CLIP-Tag wurde vom SNAP-Tag aus entwickelt um selektiv mit O²-Benzylcytosin-Substraten zu reagieren (Abbildung 3 B).¹⁰² Der Halo-Tag ist von der bakteriellen Haloalkan-Dehydrogenase abgeleitet (Abbildung 3 C).¹⁰³

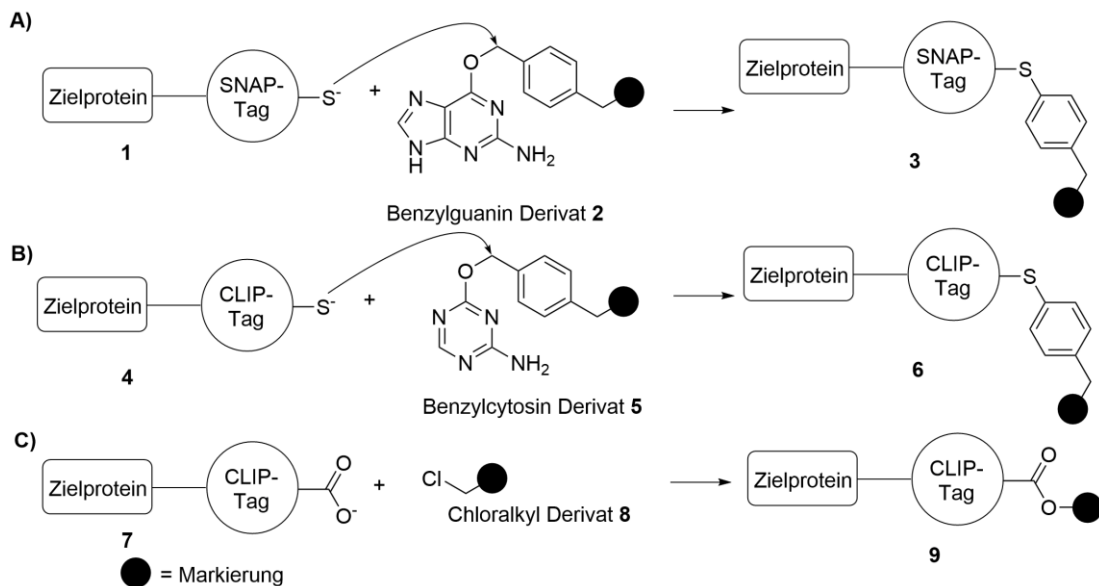


Abbildung 3: **A)** Alkylierung des hAGT-Fusionsproteins **1** an der Mercaptogruppe mit einem O⁶-Benzylguanin Derivat **2**. **B)** Alkylierung eines hAGT(M60I, Y114E, A121V, K131N, S135D, L153S, G157P, E159L)-Fusionsproteins **4** an der Mercaptogruppe mit einem O⁶-Benzylcytosin Derivat **5**. **C)** Alkylierung eines DhaA(H272F)-Fusionsproteins **7** an der Carboxylatgruppe mit einem Chloralkyl Derivat **8**.

Die Reaktion von kleinen molekularen Sonden mit minimalen Peptidmarkern umgeht den hohen sterischen Anspruch von großen Fusionsproteinen, die Abhängigkeit von einer enzymatischen Aktivität und die Anwendung unnatürlicher Aminosäuren. Einer der ersten Beispiele dieser Methodik waren FAsH und ReAsH Organosarsen-Markern.^{104,105} Griffin et al. konnten zeigen, dass rekombinante Proteine, welche Cystein an den Stellen *i*, *i*+1 und *i*+4 und *i*+5 einer α -Helix enthielten, mit FAsH-EDT₂ unter der Entstehung eines Fluoreszenzsignals markiert werden konnten (Abbildung 4 A).¹⁰⁴ FAsH-EDT₂ fluoresziert nur in Verbindung mit der Tetracysteinsequenz.

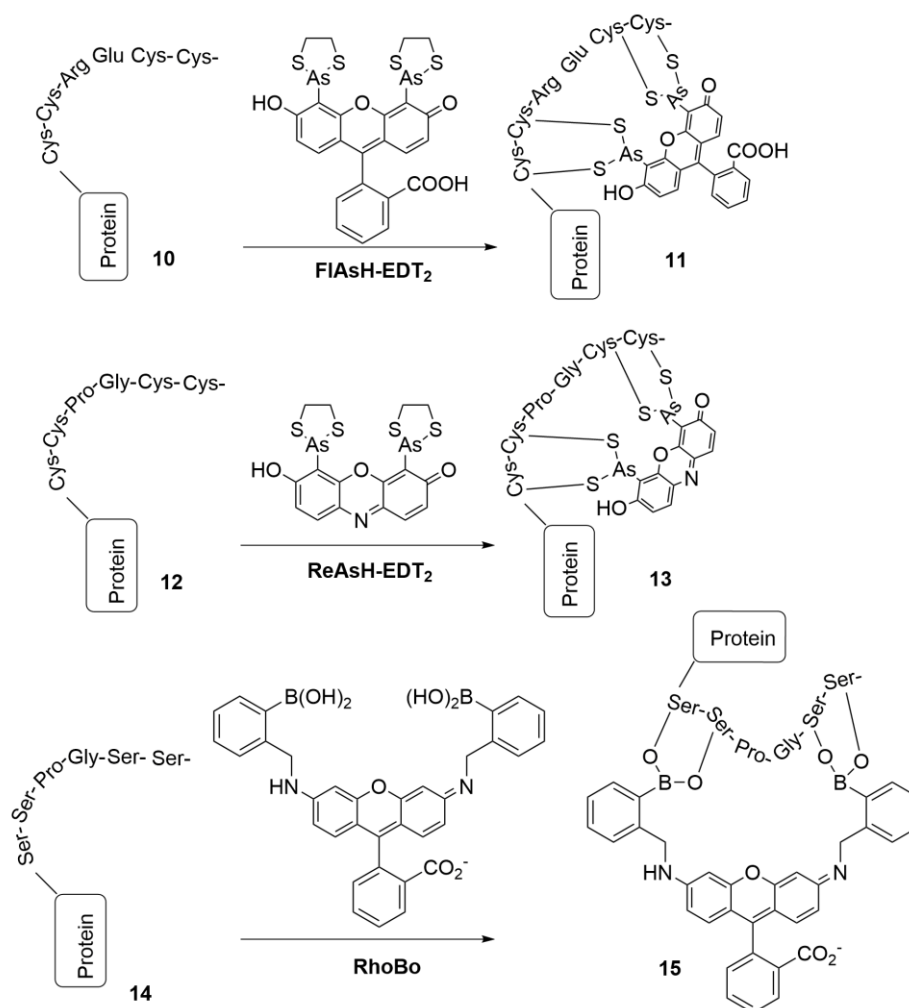


Abbildung 4: Andeutung des Mechanismus zur Fluoreszenzmarkierung eines **A)** exprimierten Tetracystein-Proteins mit *Flourescein Arsenical Hairpin Binder* (**FIAsh-EDT₂**) **B)** exprimierten Tetracystein-Proteins mit *Red Fluorescent Arsenical Hairpin Binder* (**ReAsH-EDT₂**) und **C)** einem exprimierten Tetraserin-Proteins mit einem Rhodamin-Borsäureesterderivat **RhoBo**.

Halo et al. präsentierten eine nicht-toxische und redoxunempfindliche Alternative zu FIAsh, ReAsH (Abbildung 4 B) und anderen Bisarsenfarbstoffen (Abbildung 4 C).¹⁰⁶⁻¹⁰⁸, Hier wurde ein Fluoreszenzfarbstoff als bis-Borsäureester RhoBo modifiziert. RhoBo kann Tetraserin-Sequenzen (14) erkennen und fluoreszierende bis-Borsäureserinester (15) bilden. Dies sind Beispiele von Fluoreszenz-, „Turn-On“-Sonden. Diese sind den konstanten fluoreszenten Sonden überlegen, da kein zusätzlicher Waschschrift eingeführt werden muss, um nicht reagierte oder ungebundene Sonden vom POI zu entfernen.

Die vorstehend beschriebenen Methoden bedürfen der genetischen Modifizierung des POI und können daher nicht auf Untersuchungen von Wildtypmaterial angewendet werden.

Sogenannte „Single Site“-Markierungen erlauben die Markierung von nativen Proteinen ohne eine genetische Modifikation. Native Proteine bieten die Möglichkeit mit entsprechend gestalteten Elektrophilen chemoselektiv zu reagieren. Im allgemeinen Fall bevorzugen Elektrophile nicht nur eine funktionelle Gruppe. Um eine selektive Markierung an einer gewünschten Stelle eines POI zu erreichen müssen die Elektrophile mit dem reaktivsten Rest reagieren können, ohne mit den anderen unreaktiveren Resten eine Reaktion einzugehen. Nach diesem Prinzip konnten selektive einfache Markierungen an Cysteinen¹⁰⁹⁻¹¹⁵, Tryptophanen¹¹⁶⁻¹¹⁹, Tyrosinen¹²⁰⁻¹²², Methioninen^{123,124}, Histidinen¹²⁵⁻¹²⁷, Amidn des Peptidrückrads^{128,129}, Carbonsäureresten¹³⁰⁻¹³², Lysinen^{133,134} und N-terminalen Aminen¹³⁵⁻¹³⁹ durchgeführt werden.

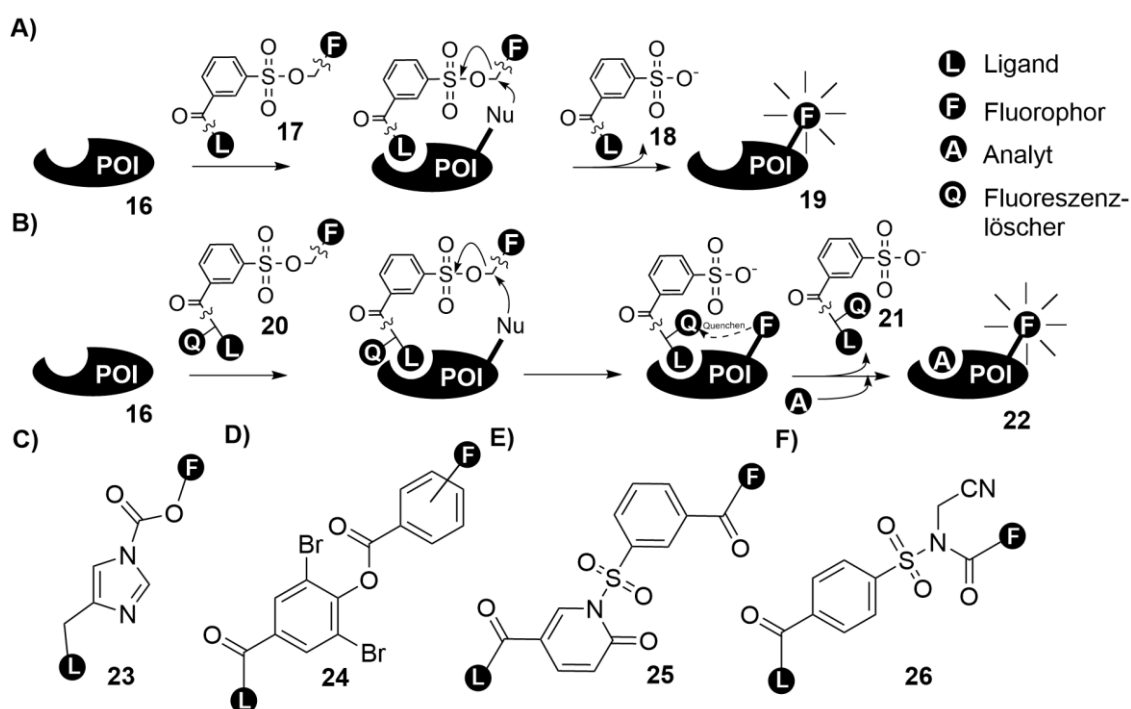


Abbildung 5: **A)** Die Markierung eines *protein of interest* (POI) mit einem Fluorophor (F) mit Hilfe der Liganden-gesteuerten Tosylchemie. **B)** Die Liganden-gesteuerte Tosylchemie erlaubt die direkte Synthese eines biologischen Sensors, welcher die Anwesenheit eines Analyts (A) durch eine Veränderung des Fluoreszenzsignals vom Fluorophor (F). **C)** Sonde zur Markierung eines POI mit einem Fluorophor F durch die Liganden-gesteuerte Acylimidazolchemie. **E)-F)** Mögliche Sonden zur beschleunigten Markierung eines POI nach dem Prinzip der Liganden-gesteuerten Proteinmarkierung.

Kürzlich wurde eine Methode vorgestellt, die auf der chemischen Reaktion zwischen einem Proteinliganden und dem POI beruht. Mit der Liganden-gesteuerten Tosylchemie (LDT) konnte die Gruppe um Hamachi eine Methode entwickeln, um endogene Proteine regioselektiv mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Damit konnten Proteine

in lebenden Zellen markiert werden. Weiterhin gelang so die Synthese biologischer Sonden ohne eine genetische Manipulation von Zellen.

Bei der Liganden-gesteuerten Tosylchemie werden synthetische Proteinliganden (**17**, **20**, **23-26**) verwendet, die aus einem Proteinliganden und einer reaktiven Gruppe bestehen (Abbildung 5). Dabei bindet der Proteinligand **17** das POI mit einer hohen Affinität, wodurch eine chemische Reaktion der reaktiven Gruppe und den Aminosäuren an der Proteinoberfläche durch den Templat-Effekt beschleunigt werden (Abbildung 5 A). Die Gestaltung der reaktiven Gruppe als Phenylsulfonatester bewirkt, dass das Protein durch eine SN-2 Reaktion markiert werden. Der Proteinligand ist dabei das Nukleofug (**18**). Durch den modularen Aufbau der LDT-Reagenzien lassen sich durch die Anwendung unterschiedlicher Liganden verschiedene Proteine (**16**) parallel markieren. Durch die hohe Selektivität der Liganden zu ihren Proteinen und durch die Wahl unterschiedlicher Fluoreszenzsonden, sind die Voraussetzungen für eine multiplexe Anwendung gegeben.¹⁴⁰

Die Verwendung von LDT-Verbindungen mit einem eingebauten Fluoreszenzlöcher (**20**) erlauben die Synthese von Biosensoren aus Proteinen (**22**), indem nach der SN-2 Reaktion der in der Bindungstasche des POI **16** verbleibt. Bindet nun ein Analyt das POI, wird der Fluoreszenzlöcher aus der Bindungstasche verdrängt, wodurch das Fluoreszenzsignal der Fluoreszenzmarkierung wieder hergestellt wird (Abbildung 5 B).¹⁴¹

Um die Effektivität und die Geschwindigkeit der Markierungsreaktion am POI zu verbessern, wurde die Liganden-gesteuerte Acylimidazolchemie (LDAI, vgl. **23**) angewandt (Abbildung 5 C).¹⁴² Die Geschwindigkeitskonstanten der LDT und der LDAI bewegen sich im Bereich der CuAAC. Geschwindigkeitskonstanten in der Proteinmarkierung, wie in der Tetrazin-Ligation mit Bicyclooctin oder *trans*-Cycloocten bzw. in enzymatischen Markierungsmethoden wie SNAP/CLIP-Tag, können durch verschiedene Sonden (**23-26**) erreicht werden (Abbildung 5 D-F).¹⁴³

Nicht immer kann garantiert werden, dass ein POI in der Nähe der Ligandenbindungsstelle eine reaktive Gruppe bereithält eine allgemeine Anwendbarkeit könnte eine Methode versprechen, bei der das Protein zwei Liganden bindet und damit eine Reaktion zwischen proteingebundenen Liganden begünstigt.

2.2 Der Templat-Effekt

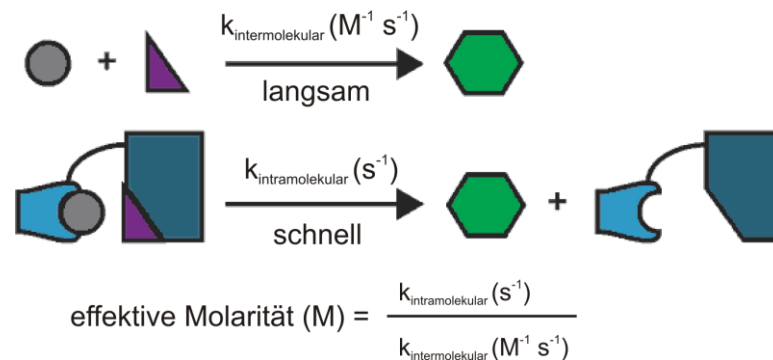


Abbildung 6: Eine langsame bimolekulare Reaktion mit der Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{intermolekular}}$ (Einheit: $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) kann beschleunigt werden, wenn die beiden Reaktanten räumlich zusammengeführt werden. In diesem Fall kann eine unimolekulare Reaktion mit der Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{intramolekular}}$ (Einheit: s^{-1}) stattfinden. Die effektive Molarität ergibt sich aus dem Verhältnis von $k_{\text{intramolekular}}$ und $k_{\text{intermolekular}}$ und wird in der Einheit M angegeben.

In zellulären Systemen liegen tausende von Reaktanten eine Reaktionslösung in sehr niedrigen Konzentrationen (nM- bis μM -Bereich) vor. Die Reaktivitäten dieser Moleküle werden durch Makromoleküle gesteuert. Diese Makromoleküle agieren als Katalysator und können gezielt Reaktanden durch Bindung erhöhen, sodass biomolekulare (Abbildung 6) Reaktionen möglich werden.

2.2.1 Nukleinsäure gesteuerte organische Synthese

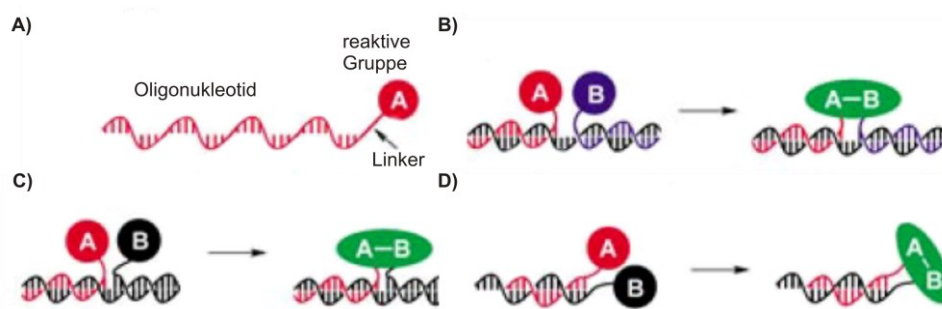


Abbildung 7: DNA-gesteuerte organische Reaktionen können durch unterschiedliche Architekturen realisiert werden. A) Struktur eines reaktiven Partners in der DNA-gesteuerten organischen Synthese. Der Reaktand besteht aus einem Nukleotid, welches über einen Linker mit einer reaktiven Gruppe verknüpft ist. B) $A+B+A'B'$ -Architektur, C) $A+BA'B'$ -Architektur (Hairpin) und $A+A'$ -Architektur einer DNA-gesteuerten Reaktion. A/B und A'/B' stehen für komplementäre Oligonukleotide, wobei das „+“ die getrennten Moleküle andeutet.

Nukleinsäuren sind ideale Template, die Reaktanden in räumliche Nähe bringen und Umsetzungen instruieren (Abbildung 7). Beispielhaft sein Replikation genetischer Information, die Transkription von DNA in RNA und die Translation von RNA in Proteine genannt. Die ersten In den ersten Versuchen von Nukleinsäure-gesteuerten

Synthese mit nichtbiologischen Reaktanten wurde die Knüpfung von Phosphodiesterbindungen durch Bindung der Reaktionspartner an ein DNA-Templat beschleunigt.

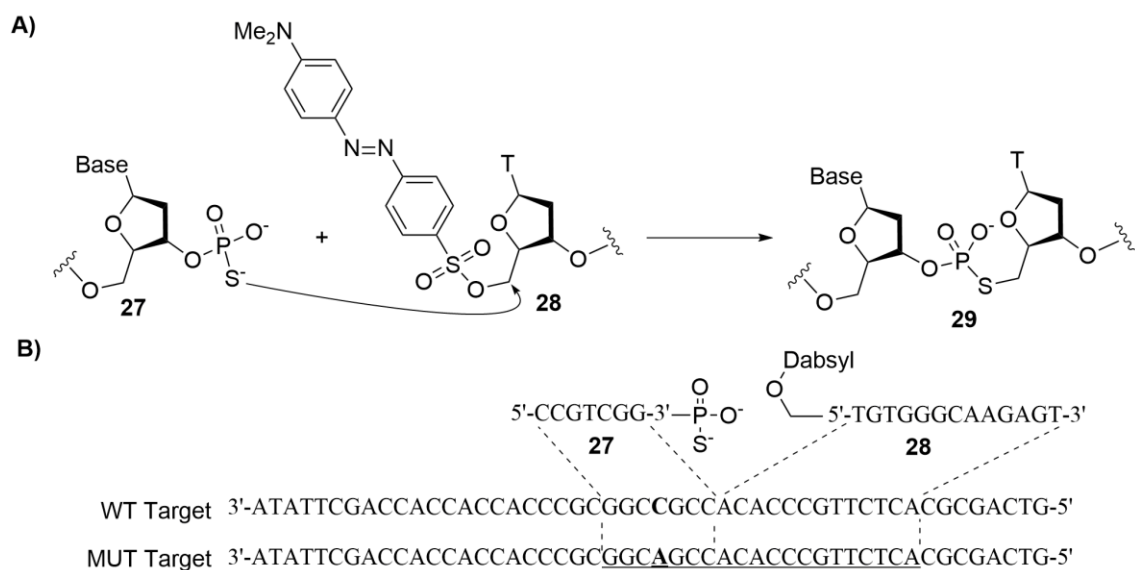


Abbildung 8: **A)** Struktur eines Dabsyl-Thymidinnukleotid und der Mechanismus der Dabsyl-Abspaltung. Die Autoligation zweier DNA-Stränge an einer komplementären DNA (WT Target und MUT Target) führt zur Abspaltung des Dabsyl-Moleküls, wodurch die Fluoreszenzlösung des Fluorophors aufgehoben wird. **B)** Die DNA-Sequenzen von WT Target und MUT Target stammen vom H-ras Protoonkogen.

Naylor und Gilham berichteten 1966 als erste von solch einer Reaktion.¹⁴⁴ Ein Polyadeninsäure ermöglichte die Verknüpfung zweier Thymidinhexadesoxynukleotiden (pT6) durch eine Phosphodiesterbindung. Die beiden pT6 konnten an Polyadeninsäure binden (vgl. Abbildung 7 B). Das 5'-Phosphat eines pT6 und die 3'-Hydroxygruppe des anderen pT6 gelangen so in räumliche Nähe, wodurch sich die effektive Molarität stark erhöhte. Durch die Aktivierung des 5'-Phosphats wurde das Reaktionsprodukt erhalten.¹⁴⁵

Orgel präsentierte eine Nukleinsäure-gesteuerte Phosphodiesterbildung mit bereits aktivierten Nukleinsäuremonomeren (Methylimidazol) und Oligomeren vorstellen.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Letsinger und Kool stellten die DNA und RNA gesteuerte Phosphothioester- und Phosphoselenothioesterbildung vor.^{149,150} Im Rahmen dieser Arbeit ist die Autoligation mit Fluoreszenzlösung (eine fluorogene DNA-gesteuerte Oligonukleotidverknüpfung) hervorzuheben.¹⁵¹ Die Gruppe um Kool konnte die DNA-gesteuerte Oligonukleotidverknüpfung durch eine Erhöhung eines Fluoreszenzsignals in Lösung und auf fester Phase nachweisen (Abbildung 8 A). Eine Dabsylgruppe an der aktivierten 5'-Hydroxylgruppe in einem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid (**28**) wurde als Fluchtgruppe in einer nukleophilen Substitution eingesetzt. Die nukleophile

Mercaptogruppe vom 3'-Phosphothionat **27** am zweiten Oligonukleotid konnte am 5'-Kohlenstoff angreifen. Das fluoreszenzlöschende Dabsylmolekül war nun nicht mehr in räumlicher Nähe zur Fluoreszenzmarkierung, wodurch ein Anstieg des Fluoreszenzsignals nachweisbar war (Abbildung 8 B). Die Reaktion zu **29** wurde durch die Anwesenheit einer komplementären DNA-Sequenz als Templat beschleunigt. Die Reaktion konnte in Lösung, aber auch auf fester Phase durchgeführt werden. Durch diese Methode konnte DNA nachgewiesen werden und Einzelbasenmutationen im DNA-Templat identifiziert werden. DNA-gesteuerte Reaktionen werden aktuell häufig zur Entdeckung kleiner Wirkstoffmoleküle in kodierten chemischen Bibliotheken eingesetzt¹⁵² In der DNA-gesteuerten organischen Synthese finden mittlerweile eine Vielzahl bioorthogonaler Reaktionen ihre Anwendung.¹⁵³⁻¹⁶⁵

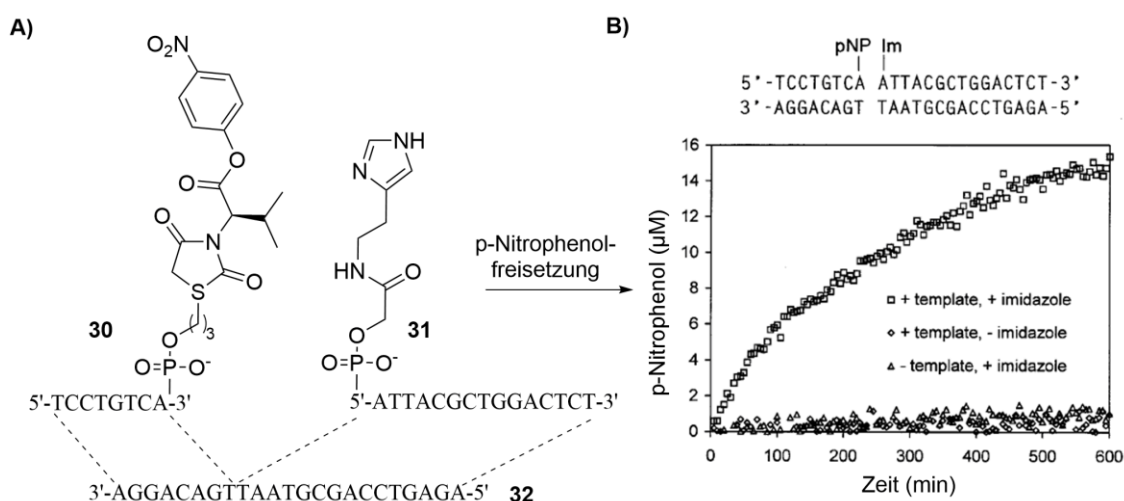


Abbildung 9: **A)** Eine A+B+A'B'-Architektur einer DNA-gesteuerten Nitrophenolesterhydrolyse. Ein Wirkstoffvorläufer wird durch ein Nukleinsäure-Templat in die räumliche Nähe eines Imidazols gebracht, wodurch die Nitrophenolesterhydrolyse eingeleitet wird. **B)** Überwachung der Nitrophenolesterhydrolyse im UV/Vis-Spektrometer in Anwesenheit des Templats und der Imidazolsonde (Quadrat), in Abwesenheit des Templats und in Abwesenheit der Imidazolsonde (Raute) und in Abwesenheit des Templats und Anwesenheit der Imidazolsonde (Dreieck).

Die DNA Chip Technologie und die genetische Sequenzierung erlaubten die Untersuchung der genetischen Zusammensetzung von kranken Zellen.^{166,167} Die in kranken Zellen einzigartige und überexprimierte Nukleinsäuresequenzen können als Templat agieren, um Nukleinsäure modifizierte Prodrugs (Wirkstoffmolekülvorläufer) zu aktivieren. So würde ein zytotoxisches Molekül in der kranken Zelle gebildet werden, um diese zu töten. Ma et. al.¹⁶⁸ gelang die erste Nukleinsäure-gesteuerte Freisetzung eines Wirkstoffs. Sie konnten zeigen, dass genetische Informationen zur sequenzspezifischen Synthese von Wirkstoffen verwendet werden können, um selektiv kranke Zellen zu töten.¹⁶⁸ Imidazol wurde als Katalysator zur Wirkstofffreigabe

verwendet und am 5'-Ende einer RNA-Sequenz geknüpft (**31**). Am 3'-Ende einer weiteren DNA-Sequenz wurde ein *p*-Nitrophenolester (**30**) eines Wirkstoffs geknüpft (Abbildung 9). Treffen beide Sequenzen auf eine komplementäre DNA-Sequenz **32**, kann Imidazol die *para*-Nitrophenolesterspaltung initiieren. Die Reaktion wurde kolorimetrisch überwacht (Abbildung 9). Dieses Modellkonzept konnte ebenfalls auf eine RNA-gesteuerte (C Loop von E. Coli 5S rRNA) Wirkstofffreigabe durch die Zusammenführung von PNA-Fragmenten übertragen werden.¹⁶⁹ Die Esterhydrolyse ist keine bioorthogonale Reaktion. Esterbindungsspaltungen in Prodrugs finden auch allein im Serum mit maximalen Halbwertszeiten von 3 h statt.¹⁷⁰

2.2.2 Peptid-und Proteingesteuerte organische Reaktionen

Mit der Anwendung von DNA, mit ihrer strikten Watson-Crick-Basenpaarung und der daraus resultierenden vorhersehbaren Eigenschaften, als Templat, konnten beeindruckende Ergebnisse erzielt werden. Proteine hingegen können sich in komplexen Faltungen anordnen, sodass die Raumstruktur nicht einfach vorhergesehen. Deshalb ist es schwierig Templat-kontrollierte Reaktionen zu programmieren. Unter allen Strukturmotiven von Proteinen, sind Coiled-coil Peptide der DNA als Baustein oder Templat wohl am ähnlichsten. Sie können so designt werden, dass Sie zur Bildung komplementärer Coiled-coil-Doppelstränge befähigt sind. So ist es möglich, dass auch mit Coiled-coil-Peptiden, wie mit DNA, Nanometer große Strukturen aufgebaut werden.¹⁷¹⁻¹⁷³

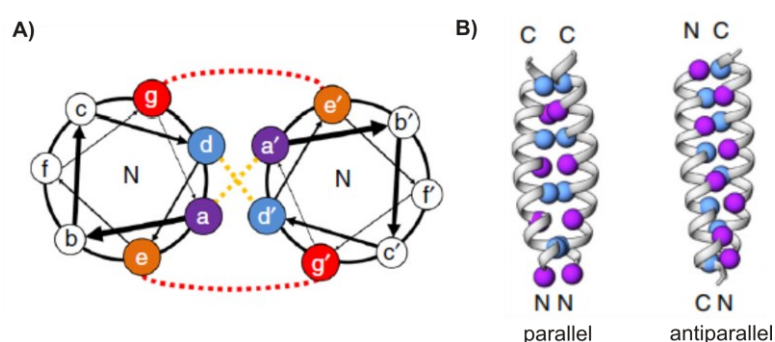


Abbildung 10: **A)** Coiled-Coil-Peptide bestehen aus einem Segment aus sieben Aminosäuren a, b, c, d, e, f und g (Heptad-Wiederholung). **B)** Coiled-coil-Dimere können in einer parallelen oder antiparallelen Orientierung aneinander binden.

Coiled-coil-Peptide besitzen eine definierte amphiphile Struktur, welche aus einer sich wiederholenden Sequenz von Hepta-Repeats besteht (Abbildung 10). Die Hepta-Repeats bestehen aus einer Sequenz von sieben Aminosäuren (abcdefg)_n. Die erste (a) und die vierte (d) Aminosäure besitzen eine hydrophobe Seitenkette. Dadurch können

zwei α -Helices durch hydrophobe Wechselwirkungen aneinander binden und eine Doppelhelix ausbilden. Die Aminosäuren a und d stellen den hydrophoben Kern dieser Doppelhelix dar. Die Bindung zweier α -Helices wird durch entgegengesetzt geladene Aminosäuren an den Position e und g durch elektrostatische Wechselwirkungen verstärkt (Abbildung 10). Zwei oder mehr komplementäre α -Helices können eine in sich verdrehte linksgängige Supercoil-Struktur mit einem Neigungswinkel von 20° bilden.¹⁷⁴ Laut Francis Crick besteht die Oberfläche von α -Helices aus sogenannten Erhebungen und Vertiefungen. Dabei zeigt die Peptidkette einer α -Helices eine Drehung alle 3.5-3.6 Aminosäuren auf.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷

Die Peptide (EIAALEK)_n und (KIAALKE)_n, auch als E_n und K_n bezeichnet, bilden die Grundlage vieler Modellsysteme und folgen der eben angesprochenen Heptad-Sequenz (abcdefg)_n. Diese Peptidpaare (bei unterschiedlichen n) wurden in der Gruppe um Hodges designt. So wurde gezeigt, dass Peptide (EIAALEK)₃ (E3) und (KIAALKE)₃ (K3) mit einer Dissoziationskonstante von K_D=70 nM.¹⁷⁸

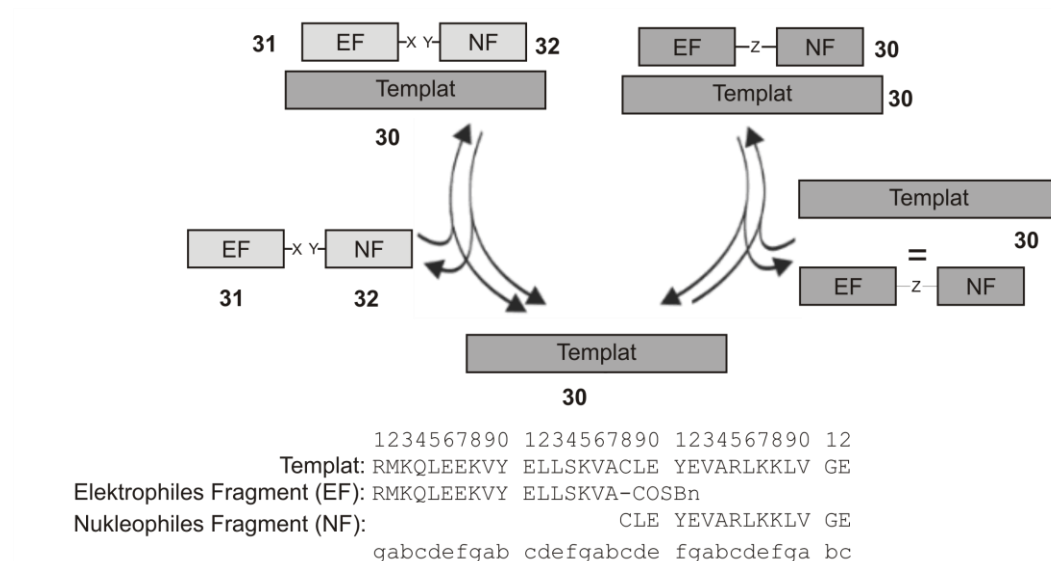


Abbildung 11: Das Peptid-Template 30 beschleunigt die native chemische Peptidverknüpfung von 31 und 32. Peptid 30 ist ein selbstreplizierendes Peptid.

Heute sind α -helicale Coiled-coils oft der Startpunkt um neue synthetisch-biologische Systeme durch das Zusammenfügen von Nanometer großen Strukturen aus programmierten Peptidbausteinen zu entwickeln. Diese Peptidbausteine können genutzt werden um komplexere 2D- oder 3D-Strukturen aufzubauen, wie es heute schon mit DNA möglich ist.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ Die Regeln, welche die Struktur, den Oligomerisationsgrad und die Spezifität zum Oligomerisationspartner bestimmen, sind für α -helicale Coiled-coils weiter entwickelt als in anderen Faltsmotiven von Proteinen.¹⁸²⁻¹⁸⁵ Heutzutage können

durch Algorithmen Coiled-Coil-Peptidketten gefunden werden, die gezielt gewünschte dreidimensionale Formen annehmen (Coiled-coil-Peptid-Origami).^{171,186} Solche *de novo* designte Strukturen können auf Änderungen im pH-Wert der Umgebung reagieren und dadurch z. B. Wirkstoffe aus Liposomen freizulassen.¹⁸⁷ Weiterhin können sie ihre Struktur durch die Bindung von Metallionen verändern.¹⁸⁸

Templat **30** folgt ebenfalls dem oben genannten Strukturmotiv (Abbildung 11). Die 32-mer α -Helix **30** ist Teil der Sequenz der Leucin-Zipper-Domäne im Hefe-Transkriptionsfaktor GCN4.¹⁸⁹ Das Experiment von Ghadiri bildet die Basis der Ligationsversuche mit Coiled-coil-Peptiden. Die Positionen a und a' wurden hier mit Valin besetzt, Position d und d' entsprechend mit Leucin. Positionen g, g', e und e' waren alternierend mit Lysin und Glutaminsäure besetzt. Die Peptide **31** und **32** stellen Fragmente des Templats **30** dar. Dabei war **31** ein Benzyl-Thioester (elektrophiles Fragment) und **32** ein N-terminales Cysteinylpeptid (nukleophiles Fragment). Diese beiden Peptide können entsprechend des Prinzips der Doppelhelix miteinander wechselwirken. Der Thioester und das N-terminale Cysteinylpeptid können nun nach dem Mechanismus der NCL ihr natives Verknüpfungsprodukt **78** bilden. Besonders hierbei war, dass das Verknüpfungsprodukt **30** wieder als Templat für die Reaktion zur Verfügung stand. Folglich handelt es sich hierbei um eine autokatalytische Reaktion, die in Anwesenheit des Templats um einen Faktor von 500 beschleunigt werden konnte.¹⁹⁰ Das allgemeine Strukturmotiv dieser α -Helices bietet die Möglichkeit auch Sequenzen zu konstruieren, welche nicht in der Natur vorkommen.¹⁹¹ Dabei können in entsprechenden Templat-gesteuerten Ligationsexperimenten Beschleunigungsfaktoren von bis zu 4100 erreicht werden.¹⁹² Da die Bildung eines Ligationsprodukts bei geringer Reaktanten-Konzentration die Anwesenheit eines Templats anzeigen kann, wird dieses Reaktionsprinzip auch für den Nachweis von Proteinen verwendet. So können Sonden konstruiert werden, welche die Anwesenheit, den Ort oder die Funktion von Proteinen in der Zelle bestimmen können.¹⁹³

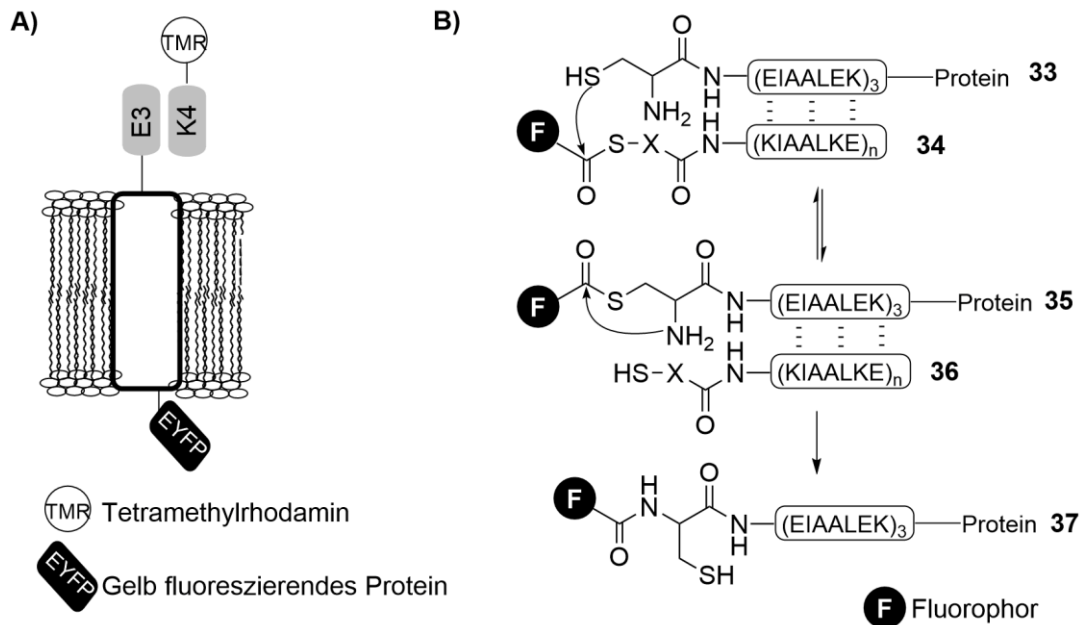


Abbildung 12: **A)** Prinzip zur Markierung des exprimierten (EIAALEK)₃-Prostaglandin E2 EP3 β Subtyp EYFP mit Tetramethylrhodamin-(KIAALKE)₃.¹⁹⁴ **B)** Mechanismus eines exprimierten Cys-(EIAALEK)₃-Proteins mit einer Fluorophor-tragenden (KIAALKE)_n-Sonde. Der Fluorophor wird durch einen Acyl-Transfer auf das Protein übertragen.¹⁹⁵

In Abschnitt 2.1.1 wurde bereits die Markierung von Proteinen besprochen und wie diese die mikroskopische Bildgebung von Proteinlokalisationen und Proteinfunktionen in lebenden Zellen ermöglicht. Dabei spielt die Größe der Markierung eine enorm wichtige Rolle. Matsuzaki et al. konnten mit Hilfe der fluoreszenzmarkierten K3- und K4-Peptide (21 und 28 Aminosäuren, (Abbildung 12 A) EP3 β -Rezeptoren, die um eine E3-Sequenz verlängert wurden, nicht-kovalent markieren und unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen.¹⁹⁴ Reinhardt et al. entwickelten eine äußerst kleine Proteinmarkierung (< 23 Aminosäuren, Abbildung 12 B), welche die Dimerisierung von Coiled-coil-Peptiden nutzt, um die Übertragung eines Fluoreszenzfarbstoffes zu ermöglichen. Dies gelang, indem ein Coil-Peptidthioester auf ein Cystein-E3-modifiziertes G-Protein gekoppelten Rezeptor in lebenden Zellen gegeben wurde.^{195,196} Ein Zielprotein (33) wird mit der Peptidsequenz Cys-E3 koexprimiert. Die fluoreszente Kn-Thioestersonde 34 bindet die E3-Domäne von 33. Durch die induzierte Erhöhung der effektiven Konzentration findet ein Thioesteraustausch zwischen 33 und 34 statt, wodurch der neue Thioester 35 entsteht. Anschließend wird durch eine S→N-Acyl-Umlagerung der übertragene Fluorophor irreversibel am Zielprotein (37) gebunden.

Um Proteine mit Hilfe des Templat-Effekts nachzuweisen, wird auf die Strategie der Ligandenbindung zurückgegriffen. Voraussetzung hierfür ist, dass das nachzuweisende

Protein zwei räumlich benachbarte Bindungsstellen aufweist. Zwei chemisch modifizierte Binder können diese benachbarten Bindungsstellen aufgrund ihrer Affinität binden. Die chemischen Modifikationen der beiden Binder ermöglichen nun durch die erhöhte lokale Konzentration eine chemische Reaktion, welche ein Signal generiert. Winssinger et al. gelang dadurch der Nachweis von Acetyl-CoA-Carboxylase in Zellen durch Ligandenbindung (Abbildung 13). Als Ligand wurde Biotin verwendet. In einem Modellsystem fand Streptavidin, als Templat Anwendung. Ein Biotin-Ligand wurde mit einem Ruthenium-Komplex modifiziert (**38**) und ein anderer entsprechend mit einem fluoreszenz-gelöschtem Rhodamin-Farbstoff (**39**).¹⁹⁷ Binden nun beide Liganden am Streptavidin, reduziert der Ruthenium-Komplex das benachbarte Phenyl-Azid-Derivat zum entsprechenden Anilin-Derivat. Das freie Elektronenpaar am Stickstoff induziert eine konzertierte Umlagerung, wodurch das Rhodamin-Carbamat eliminiert (**40**). Dadurch gewinnt das vorher Fluoreszenz-gelöschte Rhodamin seine Fluoreszenzeigenschaften wieder zurück. Das entstehende Fluoreszenzsignal kann in Echtzeit ausgelesen werden. So kann die Reaktion einfach nachverfolgt werden. Dabei konnte die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Anwesenheit des Templats um den Faktor 30 gesteigert werden. Weiterhin zeigt die nicht Templat-gesteuerte Reaktion einen geringen Hintergrund, sodass durch die Bindung der beiden Liganden das Protein Acetyl-CoA-Carboxylase in lebenden Zellen nachgewiesen werden konnte.

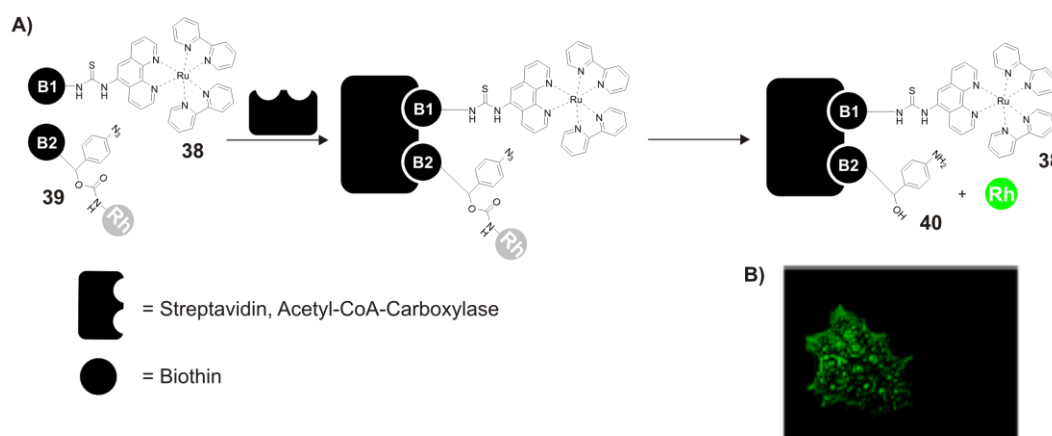


Abbildung 13: A) Die Bindung der Liganden an Streptavidin bringt beide Binder **38** und **39** in räumliche Nähe zueinander. Binder **38** ist mit einem Ruthenium-Komplex modifiziert. Binder **39** ist mit einem Fluoreszenz-gelöschtem Rhodamin-Farbstoff modifiziert. Durch die Annäherung der beiden Liganden kommt es zu einer photoinduzierten Reduktion des Azids, gefolgt von der Freisetzung des fluoreszenten Rhodamin-Farbstoffs. B) Fluoreszenzbildgebung in BT474 Zellen.

Die KIX-Domäne von CBP (CREB bindendes Protein) enthält verschiedene Bindungsstellen für unterschiedliche Binder (Abbildung 14). Diese KIX-Domäne kann unterschiedliche Peptidsequenzen verschiedener Bindungspartner binden. Dabei

befinden sich die Bindungsstellen zweier Peptide direkt in räumlicher Nähe. Es handelt sich dabei um ein Peptidfragment von CREB **41** (*cAMP response-element binding protein*) und einem Peptidfragment der KIX-bindenden Domäne von MLL **42** (*mixed-lineage leukemia*).¹⁹⁸

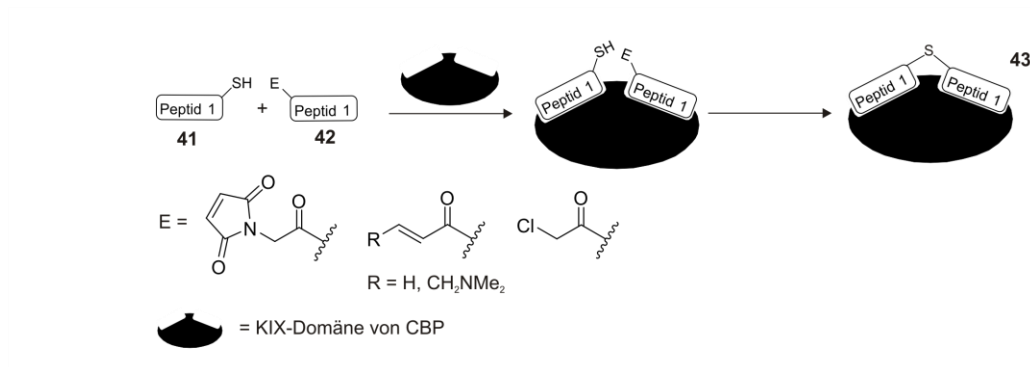


Abbildung 14: Die chemische Verknüpfung von **41** und **42** wird durch die Anwesenheit der KIX-Domäne beschleunigt.

Dabei wurde CREB N-terminal mit verschiedenen Elektrophilen modifiziert. Als Elektrophile wurden Maleinimid, ein Enon und Chloracetamid verwendet. Die Reaktion zwischen beiden Peptidfragmenten verlief je nach pH-Wert nur mit geringen Ausbeuten bzw. lief gar nicht ab. Durch Erhöhung des pH-Wertes konnten die Ausbeuten verbessert werden. Für das Chloracetamid konnten Geschwindigkeitserhöhungen der Reaktion in Anwesenheit des Templat von 250 bis 670 beobachtet werden. Die Enone hingegen zeigten keine nennenswerten Beschleunigungsraten der Reaktionsgeschwindigkeiten. Herauszuheben sei die Beschleunigung der Reaktion für E = Maleinimid (Abbildung 14, Beschleunigungsfaktor von 6200). Diese Beschleunigungsrate übertrifft die bis dahin erreichten Werte für zuvor berichtete Templat-gesteuerte Peptidligationen.

2.2.3 Protein-gesteuerte Fragmentverknüpfung in der Wirkstoffforschung

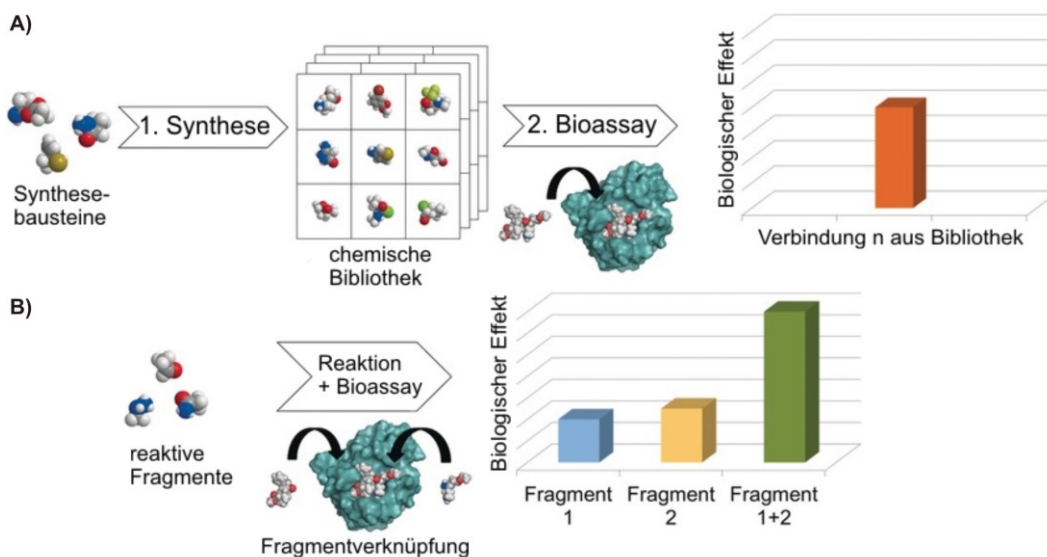


Abbildung 15: A) Klassischer Ansatz in der Wirkstoffforschung. Große chemische Bibliotheken von potentiellen Wirkstoffmolekülen werden mit Hilfe eines Bioassays auf eine Wechselwirkung mit einem Zielprotein gescreent. B) In der Templat-gesteuerten Fragmentverknüpfung werden kleinere Anzahlen an reaktiven Verbindungen mit einem Molekulargewicht < 250 Da verwendet. Die Verknüpfung der Fragmente am Protein erlaubt die Synthese und Identifikation bioaktiver Fragmentverknüpfungen zur gleichen Zeit.¹⁹⁹

Die Protein-gesteuerte Fragmentverknüpfung ist ein Konzept in der Wirkstoffforschung. Protein-gesteuerte Fragmentverknüpfungen sind chemische Reaktionen zwischen kleinen Molekülen (Fragmente), welche eine Proteinoberfläche (Templat) binden können, um ein Proteinliganden mit einer erhöhten Bindungsaffinität zu bilden (Abbildung 15). Die molekulare Erkennung der Proteine von kleinen reaktiven Fragmenten wird ausgenutzt, um bioaktive Fragmente zu identifizieren und um einen stark bindenden Liganden zu bilden. Die klassische chemische Synthese von einem Wirkstoff mit der anschließenden Vermessung in einem Bioassay kann so in einem Schritt zusammengefasst werden.^{200,201} Das Templat agiert hier nicht als Katalysator. Die Kombination von chemischer Synthese und Bioassay kann Zeit, Geld, Energie und chemische Ressourcen sparen. So reichen schon kleine Bibliotheken mit einigen hundert bis tausend reaktiven Fragmenten aus, um große Anzahlen von potentiellen Fragmentkombinationen oder Fragment-Verknüpfungsprodukten zu testen. Zur Verknüpfung beider Fragmente finden bioorthogonale Reaktionen ihre Anwendung. Das Repertoire von Protein-gesteuerten, chemoselektiven Fragmentverknüpfungen ist bereits enorm groß.²⁰²⁻²¹⁷ Dabei wird eine Verknüpfung zwischen den reaktiven Fragmenten bevorzugt, welche die Bindung zum Protein unterstützt oder diese nicht stört.¹⁹⁹ Eine Untersuchung des World Drug Index zeigt, dass sich Amid-

Verknüpfungen als prominenteste Vertreter solcher Fragmentverknüpfungen hervorheben.²⁰⁰ Zur Identifikation der Verknüpfungsprodukte werden analytische Methoden wie LC-MS, NMR-Spektroskopie und Röntgen-Kristallographie angewendet. Hierbei heben sich unterschiedliche Bioassays als besonders mächtiges Analyse-Werkzeug hervor.

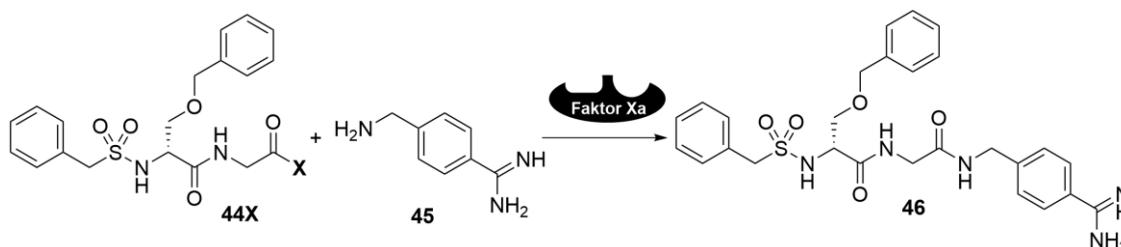


Abbildung 16: Protein-gesteuerte Verknüpfung eines Dipeptidsäure-Fragments mit 4-Aminomethylbenzamidin in Anwesenheit von Faktor Xa.

Jaegle et al. beschrieben die ersten Beispiele einer Proteintemplat-gesteuerten Bildung einer Peptidbindung ohne Hintergrundreaktion (Abbildung 16).²¹⁷ Hierfür wurden 13 unterschiedliche Carboxylsäurederivate **44X** und 4-Aminomethylbenzamidin **45** als reaktive Fragmente in Anwesenheit des Proteins Faktor Xa zu einem Verknüpfungsprodukt **46** verbunden. Die Inhibition von Faktor Xa durch **46** wurde mit Hilfe eines Enzym-Aktivitäts-Assays überwacht. Ein Templat-Effekt konnte lediglich mit Phenolester (**44X**, **X**=Phenol) und Trifluorethylesterfragmenten (**44X**, **X**=Trifluorethanol) beobachtet werden. Quantitative Untersuchungen zu den Ausbeuten des Inhibitors wurden mit Hilfe von HPLC-MS durchgeführt. Diese Berechnungen unterstützten den Mechanismus der Templat-gesteuerten Reaktion der reaktiven Fragmente.

2.3 Fluorogene Reaktionen

Für den Nachweis eines Proteins durch eine Templat-gesteuerte Reaktion wäre es wünschenswert, wenn die Produktbildung mit der Änderung eines einfach detektierbaren Signals einhergeht. Aufgrund der hohen Sensitivität werden Messungen der Fluoreszenz häufig bevorzugt. Von Interesse sind daher fluorogene Reaktionen, bei denen aus nicht fluoreszierenden Reaktionspartnern ein fluoreszierendes Molekül entsteht.

2.3.1 Bioorthogonale fluorogene chemische Reaktionen

Für die Anwendung von fluorogenen Reaktionen in einer biologischen Umgebung sollten diese biologische Prozesse nicht behindern, aber auch nicht mit Ihnen wechselwirken dürfen. Unter physiologischen Bedingungen sollen sie hohe Reaktionsgeschwindigkeiten aufweisen. Außerdem müssen sie inert gegenüber funktionellen Gruppen wie etwa Alkohole, Thiole, Amine, Phosphate oder Sulfate sein, welche in physiologischer Umgebung vorkommen, sein.²¹⁸⁻²²⁰ Reaktionen, die unter physiologischen Bedingungen ablaufen, finden in einem pH- Bereich von ca. pH = 7 bis 7.5 ab. Der arterielle pH-Wert liegt zwischen 7.35-7.45 und der zelluläre pH-Wert bei etwa 7.2.²²¹

2.3.1.1 CuAAC

Die 1893 erstmals vorgestellte und von Arthur²²² fortgeführte Beschreibung der 1,3 dipolaren [3+2]-Cycloaddition von einem Alkin **47** an ein Azid **48**, ist die Grundlage einer heute häufig verwendeten bioorthogonalen fluorogenen Reaktionen (Abbildung 17 A). Die initial beschriebene Reaktion der beiden Reaktionspartner läuft lediglich bei hohen Temperaturen oder hohen Drücken ab und führte zum Reaktionsprodukt **49**. Diese Reaktionsbedingungen erfüllen nicht die bereits genannten Bedingungen einer bioorthogonalen Reaktion. Erst die Durchführung der 1,3-dipolaren Cycloaddition eines Azids **50** mit **51** unter der Anwesenheit von katalytischen Mengen Cu(I) von Sharpless²²³ (Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition, CuAAC, Abbildung 17 B) und die so erstmalig ermöglichte Funktionalisierung von Peptiden (**53**) mit Aziden wie **54** an der festen Phase durch Meldal²²⁴ sollte diese Reaktion in den Fokus der bioorthogonalen Reaktionen stellen (Abbildung 17 C).

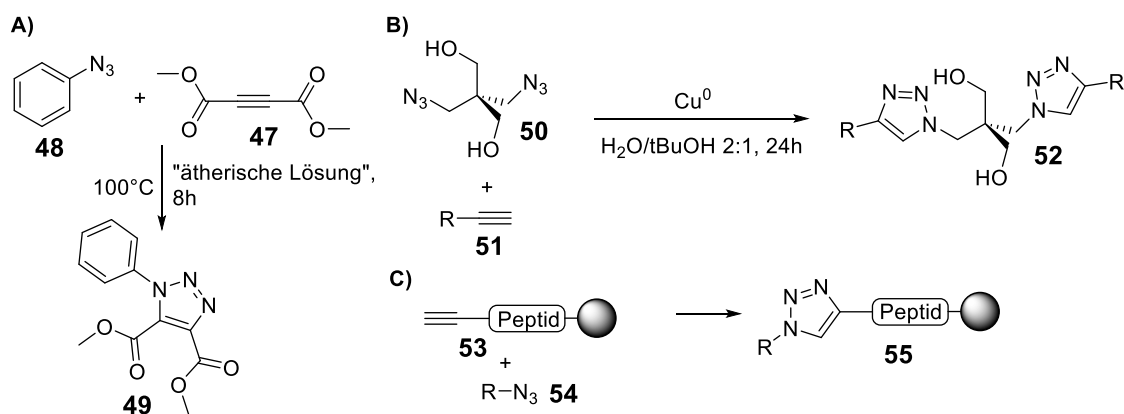


Abbildung 17: A) Reaktion von Phenylazid mit Acetylendicarbonsäuremethylester bei starker Temperatureinwirkung nach Arthur von 1893. B) Kupfer katalysierte Reaktion zwischen 2,2-Bis(azidomethyl)-1,3-propandiol und einem terminalen Alkin unter milden Bedingungen in wässriger Lösung. C) 1,4-Triazolverknüpfung eines an der festen Phase gebundenen N-terminalen Peptidalkins mit einem terminalen Azid.

Die ersten fluorogenen CuAACs wurden an Coumarinderivaten durchgeführt (Abbildung 18).^{225,226} Die fluoreszenten Eigenschaften von Coumarin werden stark durch die Substituenten an der 3- und 7-Position bestimmt. Darauf aufbauend wurde das Coumarinderivat **57** synthetisiert. Dabei unterdrückt die 7-Alkynylgruppe die Fluoreszenz von **57**. Durch die Reaktion von **57** mit **58** in Anwesenheit von CuSO₄ und Ascorbinsäure entsteht das entsprechende Triazol-verknüpfte Produkt **59**. Die Ascorbinsäure reduziert Cu(II) zur benötigten Cu(I)-Spezies. Dabei zeigt **59** eine durch die elektronendonierende Eigenschaft der Triazolgruppe nun eine starke Fluoreszenz auf.²²⁶ Auch 3-Azidocoumarin (**61**) keine Fluoreszenz. Hier wird die Fluoreszenz aufgrund des elektronenreichen α -Stickstoffs des Azidrests unterdrückt. Coumarin **61** kann mit terminalen Alkinen in Anwesenheit von Cu(I) zu den entsprechenden Triazol-verknüpften Derivaten **62** reagieren. Die Bildung des Triazols hebt die fluoreszenzunterdrückenden Eigenschaften der Azidgruppe auf. Und eine Fluoreszenz von **62** kann beobachtet werden. Beide Reaktionen laufen unter milden Bedingungen in wässrigen Lösungen ab. Coumarin ist ein kleines und biokompatibles Molekül. Dies ermöglicht es, dass jene fluorogenen Click-Reaktionen auch im Bereich der *in vitro* und *in vivo* Biokonjugationen Anwendung finden.

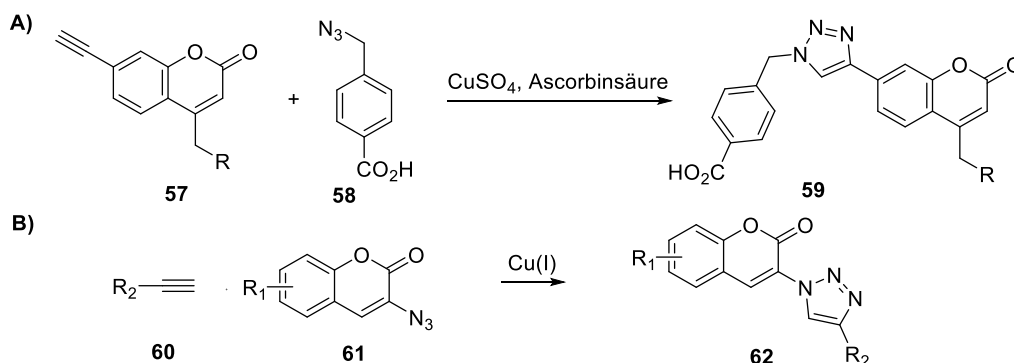


Abbildung 18: A) Nicht fluoreszentes 7-Alkin modifiziertes Coumarin **57** reagiert mit **58** zum stark fluoreszierenden **12**. B) 3-Azido Coumarinderivate **61** reagieren mit endständigen Alkinen **60** zu den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen **62**.

Verbindung **60** kann in der Markierung von Proteinen eingesetzt werden. Die Markierung von Proteinen ist hilfreich bei der Aufklärung der Zellkompartimentierung oder der Lokalisation von Proteinen bei Zell-Zell-Interaktionen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Alkin-modifizierte Aminosäuren können über den Weg der Proteinbiosynthese in die Sequenz von exprimierten Proteinen in einer Zelle eingeschleust werden. Hier wurde Methionin und Phenylalanin durch die künstlichen Aminosäuren Homopropargylglycin oder Ethinylphenylamin ersetzt. Gegensatz zu einer spezifischen Markierung eines Proteins, wurde so das Proteom der Zelle Fluoreszenz-markiert²²⁷ Die modifizierten Zellen wurden anschließend mit **61** ($\text{R}_1 = 7\text{-Hydroxy}$), Cu(I) und TBTA inkubiert. Anschließend konnte die Position der modifizierten Proteine unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.²²⁸

2.3.1.2 Staudinger-Ligation

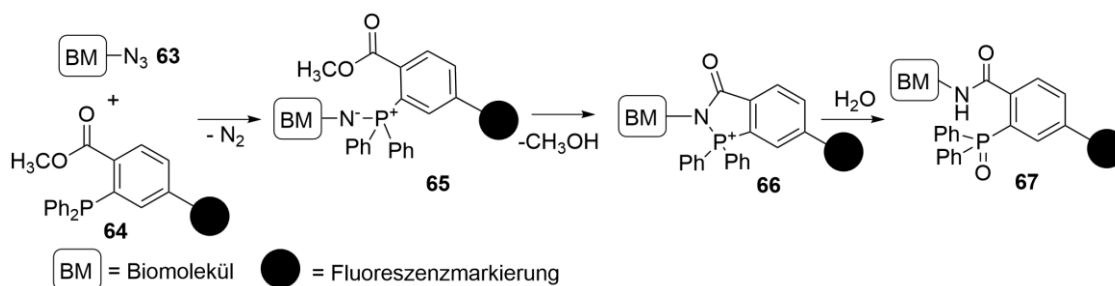


Abbildung 19: Die Staudinger Ligation eines Azid-modifizierten Biomoleküls **63** mit einem Fluoreszenz-markierten Triarylphosphin **64**.

Azide kommen in biologischen Systemen nicht vor und können in bioorthogonalen Reaktionen angewendet werden.²²⁹ Die Gruppe um Bertozzi nutzte die Azid-Gruppe zur Einführung von Reporter-Gruppen.²³⁰ In der sogenannten Staudinger-Ligation reagiert eine Estergruppe in ortho-Position zu einem Arylphosphin (**63**) mit einem intermediär gebildeten Aza-Ylid **65** und bildet in einer intramolekularen Reaktion eine

Amidbindung (**66**) (Abbildung 19 B).²³¹ Anschließend führt die Hydrolyse von **66** zum Ligationsprodukts **67**, welches das Phosphinoxid in der Struktur enthält.

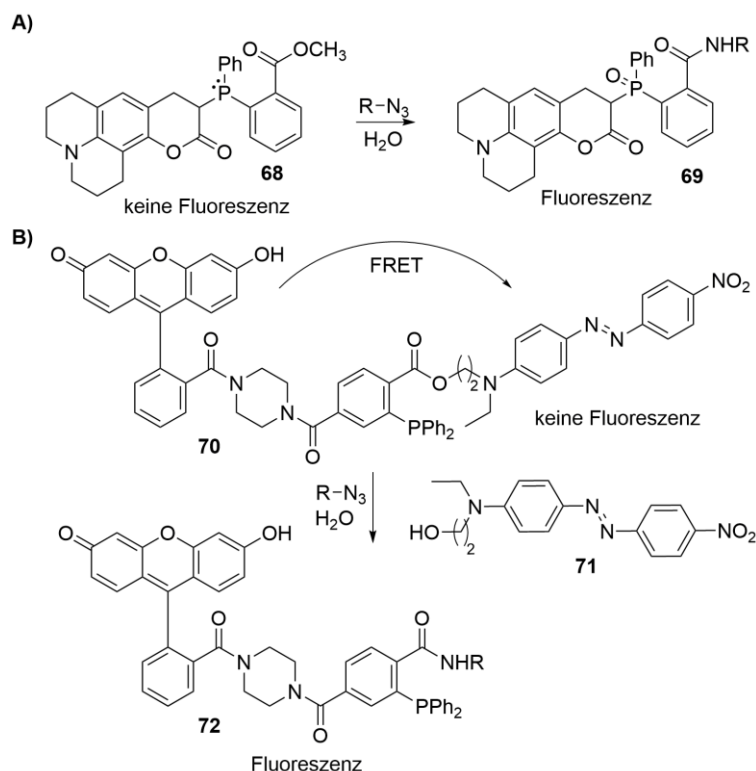


Abbildung 20: **A)** Der Coumarinfarbstoff **68** fluoresziert nach der Phosphinoxidation. **B)** Die Fluoreszenz von **70** wird durch das Dispers-Rot-Molekülteil gelöscht (FRET). Durch die Staudinger Ligation wird Dispers-Rot vom Molekül abgespalten und **72** fluoresziert erneut.

Lemieux et al.²³² platzierten das Phosphin an einem Coumarinfarbstoff (**68**), um eine fluorogene Staudinger Ligation zu realisieren (Abbildung 20 A). Die Fluoreszenz von **68** wird durch das freie Elektronenpaar am Phosphor unterdrückt. Die Staudinger-Ligation wandelt die Phosphingruppe in eine Phosphinoxid-Gruppe, wodurch das fluoreszierende **69** entsteht. Problematisch hierbei ist die beobachtete Hintergrundfluoreszenz durch die Oxidation des Phosphins an Luft.

Dieses Problem kann umgangen werden, indem oxidationsunempfindliche Phosphine, wie Triaryl-Phosphine, verwendet werden. So verwendete die Gruppe um Bertozzi den ortho-Benzoesäureester **70** zur Markierung von CHO und HeLa Zellen, welche mit Ac₄ManNAz und SiaNAz behandelt wurden (Abbildung 20 B). Durch FRET wird die Fluoreszin-Fluoreszenz von Dispers-Rot-Rest gelöscht. Der Ester wird von dem gebildeten Amin (Staudinger Reduktion) unter der Entstehung einer Peptidbindung gespalten. Dispers-Rot (**71**) verlässt das Molekül und die Fluoreszenz von Fluorescein (**72**) wird wieder hergestellt.²³³

So konnte die bioorthogonale Reaktion zwischen Aziden und Triarylphosphinen die Untersuchung von Biomolekülen in zellulärer Umgebung und in lebenden Tieren ermöglichen.^{219,234}

2.3.1.3 Native chemische Peptidverknüpfung (NCL)

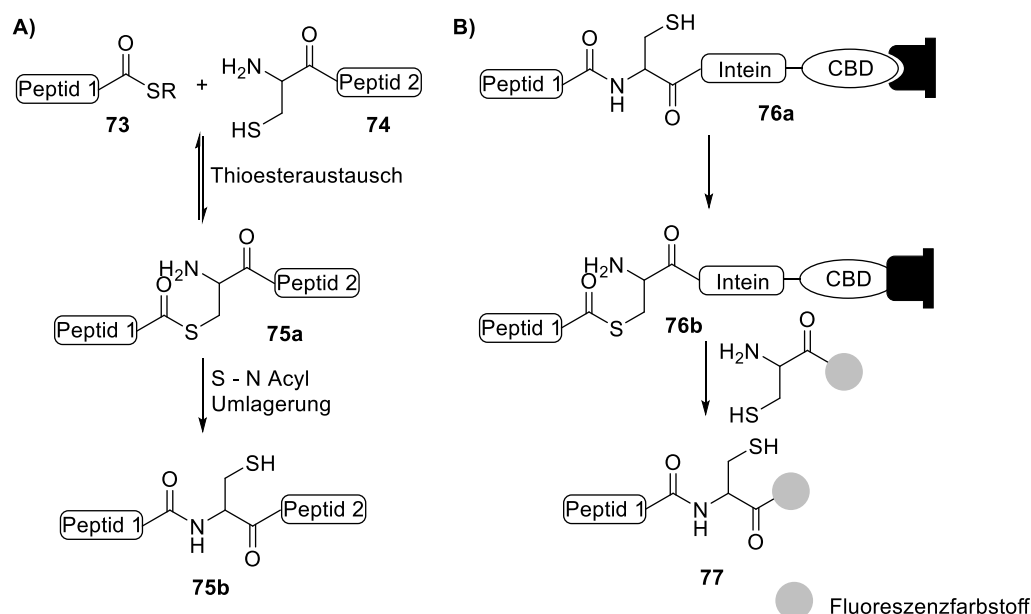


Abbildung 21: **A)** Native chemische Verknüpfung eines ungeschützten Peptid-Thioester-Fragments und eines ungeschützten N-terminalen Cysteinyl-Peptid-Fragments. Zwischen **73** und **74** findet in einer Gleichgewichtsreaktion ein Thioesteraustausch statt. Der neu gebildete Peptid-Thioester lagert sich durch eine S→N-Acyl-Umlagerung zum nativen Verknüpfungsprodukt um. **B)** Markierung eines Zielproteins mit einem Fluoreszenzfarbstoff durch die *Expressed Protein Ligation*. Ein Amid-verknüpftes Protein-Intein-Konjugat ist über eine am Intein angebrachte CBD an eine feste Phase immobilisiert. Die intrinsischen Eigenschaften des mutierten Inteins erlauben eine N- zu S-Wanderung am N-terminalen Cystein des Inteins. Durch einen Thioesteraustausch am C-Terminus des Zielproteins durch ein Fluoreszenz-markiertes Cystein-Nukleophil kommt es zu einer S- zu N-Acyl-Umlagerung.

Mit Verknüpfungsreaktionen lassen sich lange Peptide oder Proteine aus kleineren Peptidfragmenten herstellen. In 1994 führte die Arbeitsgruppe um Kent die native chemische Verknüpfung ein (Abbildung 21 A).²³⁵ Dabei reagiert ein Peptidthioesterfragment mit einem N-terminalen Cysteinylpeptidfragment. Bei der Reaktion wird eine Amidbindung gebildet und somit ein längeres Peptid erhalten. Im ersten Reaktionsschritt kommt es zu einem Thioesteraustausch. Die Mercaptogruppe im Cysteinylpeptid **74** greift am Thioester **73** an, um einen neuen Thioester zu generieren. Dieser intermolekulare Thioesteraustausch ist eine Gleichgewichtsreaktion und wird durch eine intramolekulare S→N-Acyl-Umlagerung unterbrochen. Ausgehend von **75a** entsteht eine native Peptidbindung im Ligationsprodukt **75b**. So konnte Interleukin-8 auf rein chemischem Weg synthetisiert werden. Die Vielseitigkeit der NCL konnte in der Synthese zahlreicher Proteine unter Beweis gestellt werden.²³⁶⁻²⁴¹

Eine Erweiterung der nativen chemischen Peptidverknüpfung stellt die *Expressed Protein Ligation* (EPL) dar (Abbildung 21 B).²⁴² Dabei wird der in der Natur vorkommende Prozess des Proteinsplittings ausgenutzt, um einen Peptid-Thioester zu generieren.

Beim Prozess des Proteinsplittings findet eine intramolekulare Umlagerung statt, bei der eine interne Sequenz (Intein) des Proteins verdrängt wird. Zugleich läuft eine Verknüpfung zweier räumlich benachbarter Sequenzen im Protein ab.^{243,244} Bei der EPL ist das Intein so mutiert, dass es nur noch in der Lage ist, durch das N-terminale Cystein eine N→S-Acyl-Umlagerung zu initiieren. Die C-terminale Abspaltung vom Zielprotein ist durch das mutierte Intein unterbunden.²⁴⁵ So verbleibt das mutierte Intein als Thioester mit dem Zielprotein, ohne dass eine S→N-Acyl-Umlagerung stattfindet. Die Peptidsequenz ist dabei über eine Chitin-bindende Domäne (CBD) an eine feste Phase gebunden. Nukleophile wie Thiole können am Festphasen-gebundenen Thioester angreifen. Hierdurch wird das Gleichgewicht zwischen **76a** und **76b** auf die Seite des Thioesters verschoben, da immer mehr Protein vom N-Terminus des Inteins entfernt wird. Handelt es sich bei dem Thiol-Nukleophil um Cystein, findet ein Thioesteraustausch statt. Der neu gebildete Cystein-Thioester durchläuft spontan, wie in der NCL, eine S→N-Acyl-Umlagerung, wodurch das Cystein über eine Amidbindung am C-Terminus des Proteins gebunden wird. Trägt das Cystein einen Fluorophor, kann mit dieser Methode eine Fluoreszenz-Markierung des Zielproteins **77** erreicht werden.²⁴⁶⁻²⁴⁸

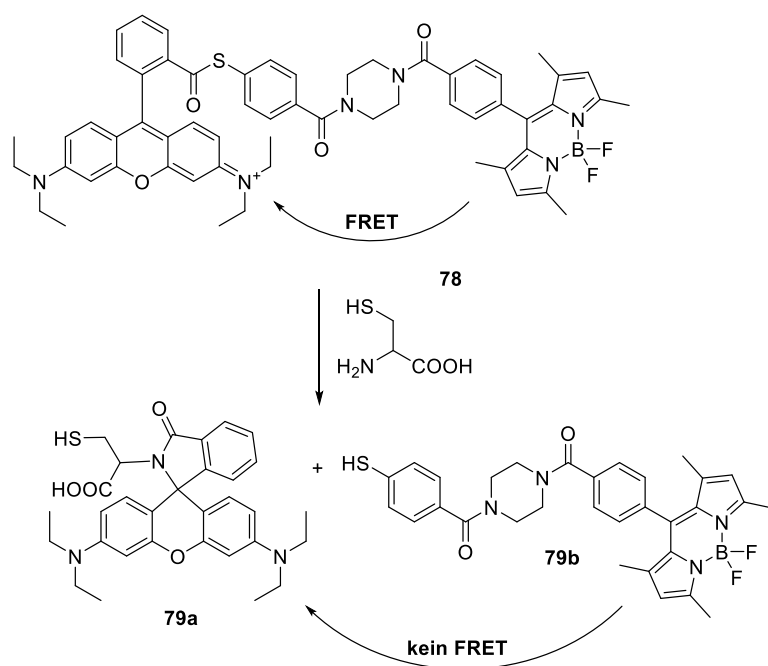


Abbildung 22: **78** ist eine Sonde zum Nachweis von Cystein durch die Mechanismus der nativen chemischen Peptidverknüpfung..

Es ist möglich, mit Rhodamin-abgeleiteten Thioestern einen spezifischen fluorogenen Nachweis von Cystein und Homocystein mit Hilfe der NCL durchzuführen (Abbildung 22). Dabei trägt der Rhodamin-Farbstoff eine Thioester Gruppe, welche als Erkennungsstelle für Cystein und Homocystein agiert. So entwickelte die Gruppe um Lin Molekül **78** als NCL-basierten Sensor für Cystein und Homocystein in lebenden Zellen.²⁴⁹ Molekül **78** besteht aus einen Rhodamin-Farbstoff, welcher über einen Thioester mit einem BODIPY-Farbstoff verbunden ist und zeigt eine Fluoreszenzemission bei 590 nm (Rhodamin-Emission) bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm (Anregungswellenlänge von BODIPY-Farbstoff). Beide Farbstoffe sind FRET-Partner, wobei der BODIPY-Farbstoff der Energiedonor und der Rhodamin-Farbstoff der entsprechende Energieakzeptor ist. Reagiert **78** mit Cystein, greift die Mercaptogruppe den Thioester nukleophil am Thioester an, wodurch ein Thioesteraustausch stattfindet. Der BODIPY-Farbstoff verlässt **78** als Fluchtgruppe. Er liegt nun als Thiolspezies **79b** vor. Hierdurch wird das FRET-System unterbrochen, da sich der Molekülteil **79b** nicht mehr in räumlicher Nähe zu **79a** befindet. Der BODIPY-Farbstoff **78** zeigt nun eine starke Fluoreszenzemission bei 510 nm bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm. Im Rhodamin-Cystein-Thioester (nicht gezeigtes Zwischenprodukt) findet eine S→N-Acyl-Umlagerung statt. Anschließend kann das acetylierte sekundäre Amin nukleophil am Kohlenstoff an Position 9 des Xanthen-Rests angreifen. Es entsteht das nicht-fluoreszente Spirolactam **79a**. Da die Entstehung des

Fluoreszenzsignals hier auf der Aufhebung des FRET-Effekts basiert, werden auch einfache Thiole detektiert, die ebenfalls den Thioester angreifen und den BODIPY-Farbstoff freisetzen.

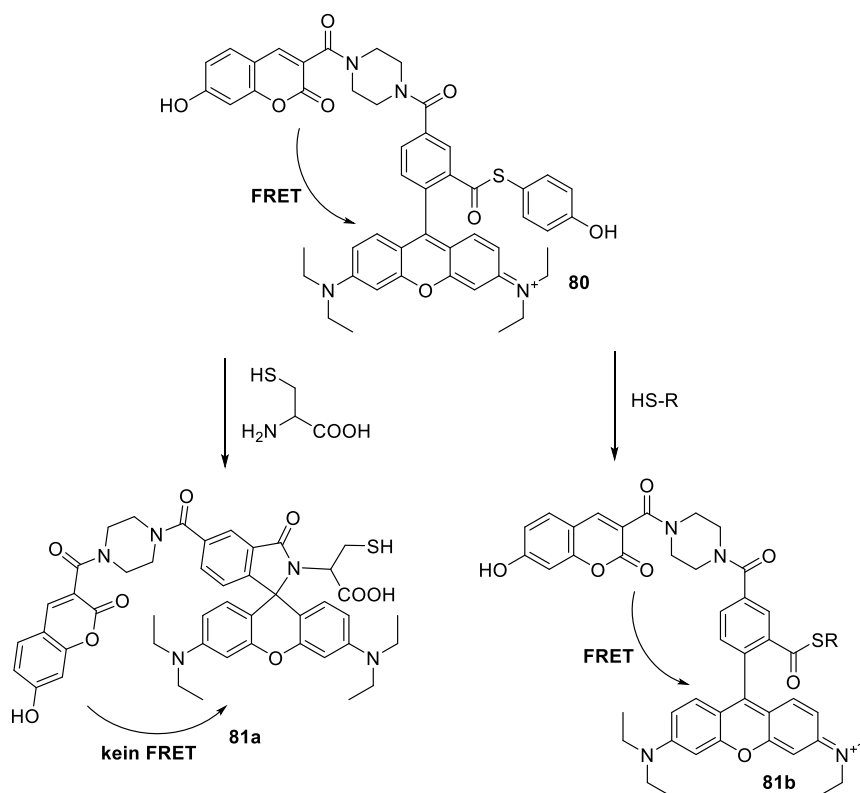


Abbildung 23: Sonde **80** spezifische Sonde für Cystein und kann Cystein von einem freien Thiol diskriminieren

Selektiver verläuft die fluorogene Erkennung von Aminothiolen mit **80** (Abbildung 23). Hier wird ebenfalls der FRET-Effekt zwischen zwei Farbstoffen genutzt. Anders als in Abbildung 22 wird das FRET-System nicht durch eine einfache Thiololyse unterbrochen, sondern nur durch einen Thioesteraustausch mit einem Aminothiol. Nur ein Aminothiol kann die Bildung des nicht-fluoreszenten Spirolactams **81a** ermöglichen. Die Spiro-Form von Rhodamin ist mehr optisch aktiv, kann nicht mehr als Fluoreszenzakzeptor zur Verfügung stehen. So erfolgt keine Löschung des das Fluoreszenz-Signals von Coumarin, welches nun bei einer Wellenlänge von 458 nm.²⁵⁰ Wird nur ein Thiol zu **80** gegeben bleibt die Rhodamin-Fluoreszenz-Emission bei 603 nm unter der Anregung des Coumarin-Rests bei 395 nm erhalten (**81b**).

2.3.1.4 weitere bioorthogonale Verknüpfungsreaktionen

Es gibt deutlich mehr fluorogene bioorthogonale Reaktionen. Die wichtigsten sind hier die Tetrazin-Ligation und die spannungskontrollierte Azid-Alkin-Cycloaddition.

Die bioorthogonale Tetrazin-Ligation fast Diels-Alder Reaktionen mit inversen Elektronenbedarf mit 1,2,4,5-Tetrazinen und verschiedenen Dienophilen zusammen. 2008 wurde die Tetrazin-Ligation unabhängig von zwei Forschungsgruppen beschrieben.^{251,252} Tetrazin besitzt zwei wichtige Eigenschaften, die für eine fluorogene Reaktion wichtig sind. Tetrazin Licht im Wellenlängenbereich von 500-550 nm absorbieren, wodurch es als Fluoreszenzlöcher in FRET-Studien Anwendung findet. Zusätzlich kann Tetrazin auch ohne eine spektrale Überlappung von Fluoreszenz-Akzeptor und Donor die Fluoreszenz in einem aromatischen System unterdrücken. Dies geschieht über einen schnellen Energietransfer innerhalb des aromatischen Systems.²⁵³ So konnten fluorogene bioorthogonale Moleküle wie die 2',7'-Difluorfluoreszin-Sonde **82a**, die BODIPY-Sonde **82b** und die Tetramethylrhodamin-Sonde **82c** synthetisiert werden. Reagieren diese Sonden mit einer Cyclopropengruppe entstehen die fluoreszierenden Moleküle **83a-c** (Abbildung 24).²⁵⁴

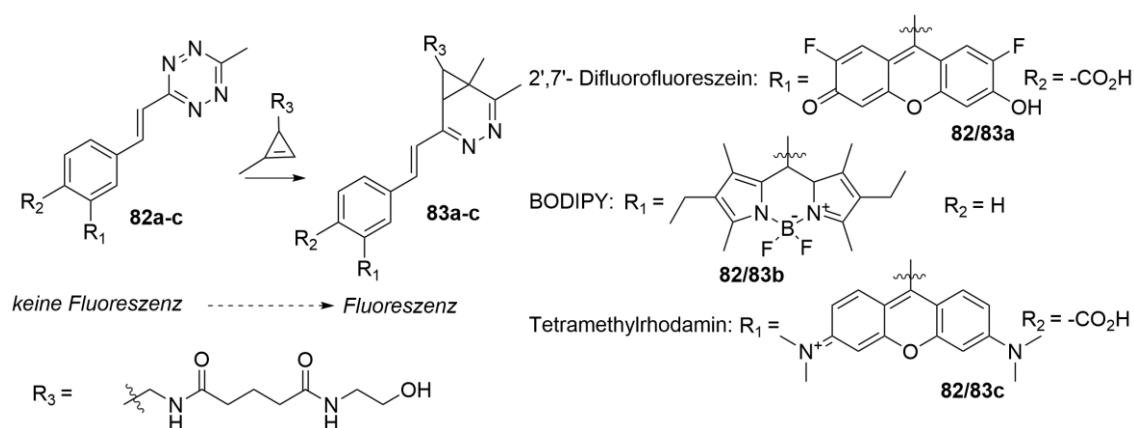


Abbildung 24: A) Reaktionsschema der Tetrazin-Ligation nach dem Mechanismus einer Diels-Alder Reaktion eines trans-Cykloooktens mit Tetrazin-Derivaten. B) Fluorogene Reaktion von **36a-c** mit einem Cyclopropen-Derivat zu **37a-c**. Die Reaktion der Tetrazingruppe in **36a-c** erlaubt die Wiederherstellung der Fluoreszenz in **37a-c**.

Die Tetrazin-Ligation kann zum Nachweis von Nukleinsäure Molekülen, indem passende Tetrazine und Dienophile eine Nukleinsäure-gesteuerte fluorogene Reaktion eingehen (Abbildung 25).^{255,256} Erste Untersuchungen wurden mit Methylcyclopropen am reaktiven Oligonukleotid **84b** durchgeführt. Ein anderes Oligonukleotid **84a** trägt dabei ein Fluorophor und Tetrazin als Fluoreszenzlöcher. In Anwesenheit eines Templats können beide reaktiven Oligonukleotide miteinander reagieren, wodurch ein Pyridazin-Derivat **84c** gebildet wird. Die fluoreszenzlöschende Funktionalität des Tetrazinrests wird aufgehoben, wodurch die Fluoreszenz des Fluorophors wieder hergestellt wird.^{257,258}

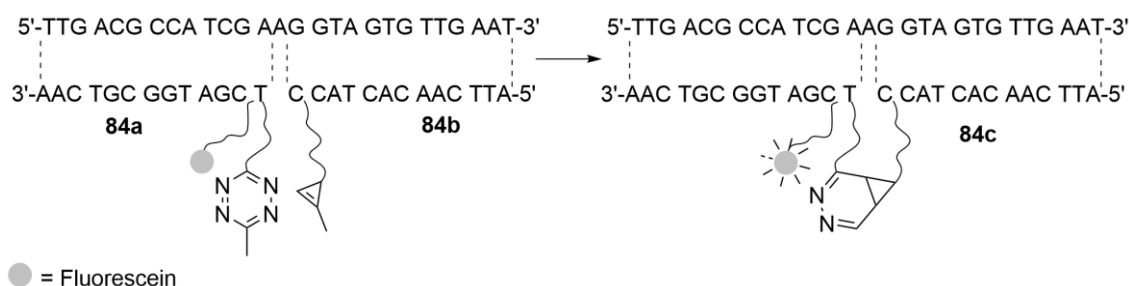


Abbildung 25: Schematische Darstellung einer Templat-gesteuerten Tetrazin-Ligation.

Im Gegensatz zur bereits beschriebenen CuAAC können in der spannungsvermittelten Alkin-Azid Cycloaddition (SPAAC) Alkin und Azid ohne die Anwesenheit potentiell giftiger Metallkatalysatoren miteinander reagieren (Abbildung 26). Typische sogenannte gespannte Alkine können Cyclooctine, difluorierte Cyclooctine, Dibenzylcyclooctinole oder etwa Bicyklononine sein. Wittig und Krebs berichteten, das Cyclooctin explosionsartig mit Phenylazid reagiert.²⁵⁹ Erste Experimente von Bertozzi et al. verwendeten ein Coumarin-konjugiertes Cyclooctin **85a** als Fluorophor, wobei die Reaktion mit 2-Azidoethanol zu **85b** eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um den Faktor 10, verglichen zu **85a** alleine, zeigte (Abbildung 26 A).²⁶⁰

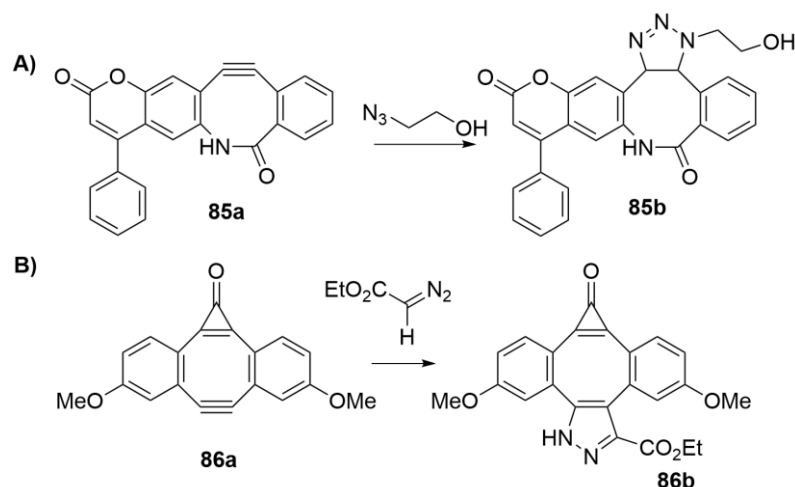


Abbildung 26: A) Erste Experimente mit eine Cyclooctin modifizierten Coumarin. B) SPAAC

Durch die Veränderung des Cyclooctinderivats zu Dibenzocyclooctin **86a** konnte die Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei der Reaktion mit Phenylazid auf einem Faktor von 1000 erhöht werden.²⁶¹ Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass neben Aziden auch andere 1,3-Dipole wie Nitrone, Nitril Oxide und Diazoderivate mit **86a** reagieren können.²⁶² Den stärksten Anstieg in der Fluoreszenzintensität zeigte die Reaktion von **86a** mit den Diazoessigsäure-Ethylester zu **86b** (Abbildung 26 B).

3 ZIELSTELLUNG

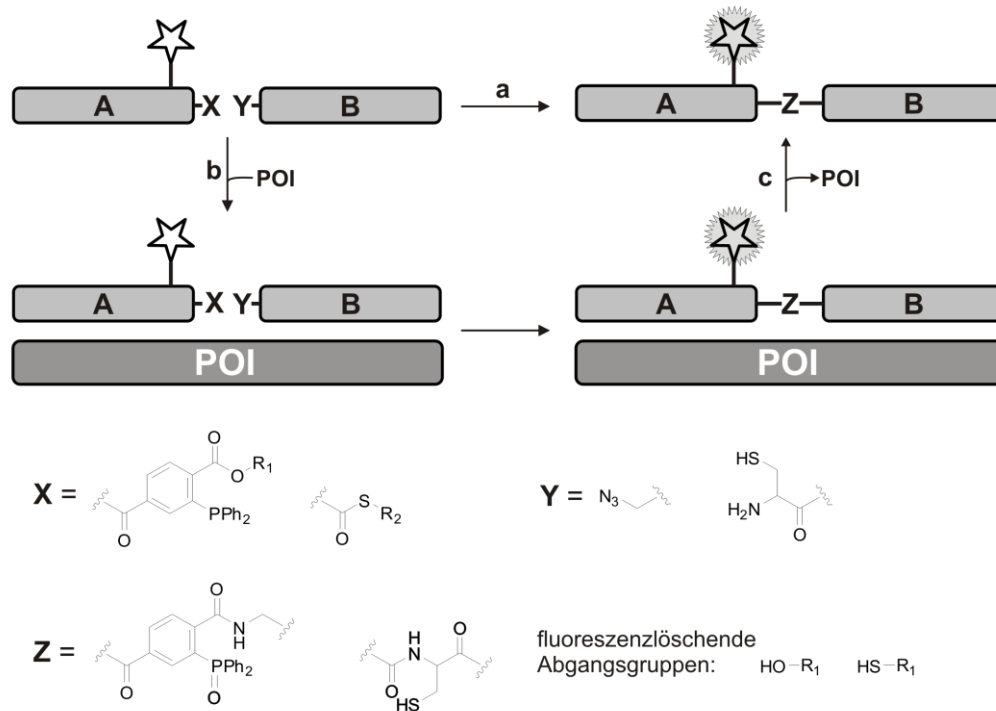


Abbildung 27: Schematische Darstellung zweier reaktiver Peptide mit **X** und **Y** als reaktive Gruppen, welche in Anwesenheit eines POIs miteinander reagieren, um mit der Verknüpfungsstelle **Z** miteinander kovalent verbunden zu sein. Die Reaktion induziert ein Fluoreszenzsignal und findet in Abwesenheit des POIs nicht statt.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Methode zur Detektion von Proteinen (*protein of interest*, POI). Dabei werden zwei Peptide, durch die Bindung an ein POI, in räumliche Nähe zueinander gebracht und zusätzlich mit reaktiven Gruppen ausgestattet. Hier soll Peptid **A** mit einer Fluoreszenz-Markierung modifiziert sein. Weiterhin soll durch einen intramolekularen FRET-Partner die Fluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffs gelöscht sein. Durch die räumliche Annäherung der reaktiven Peptide **A** und **B** wird ihre effektive Konzentration erhöht und die Reaktion zwischen den reaktiven Peptiden wird dadurch beschleunigt. In Abwesenheit des POI, sollte diese Reaktion zwischen **A** und **B** jedoch nicht oder nur sehr langsam ablaufen (Abbildung 27, Reaktionspfad a). Um das Reaktionsprodukt beider Peptide zu detektieren, soll die Reaktion ein Fluoreszenzsignal generieren. Fluoreszenzmessungen verbinden eine hohe Empfindlichkeit mit einer einfachen Durchführung. Zudem erlauben sie den Zugang zu Hochdurchsatz-Methoden. Das Fluoreszenzsignal soll entstehen, indem die vom FRET-Partner gelöschte Fluoreszenz des reaktiven Peptids **A** im Verlauf der Reaktion wieder hergestellt wird. Die Bindung der beiden reaktiven Peptide an das POI (Abbildung 27, Reaktionspfad b)

und die anschließende Bildung der Verknüpfungsstelle **Z** soll die Abspaltung des FRET-Partners induzieren, sodass ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Folglich würde ein steigendes Fluoreszenzsignal die Anwesenheit des POI anzeigen, wobei ein Ausbleiben eines Fluoreszenzsignals auf die Abwesenheit des POIs hinweist. Es wurde ein Signalsystem erdacht, in welchem die C-terminale Aminosäure ein Carboxyfluorescein und zugleich Dispers Rot (FRET-Partner von Carboxyfluorescein) trägt. Durch die Reaktion von **A** mit dem zweiten reaktiven Peptid **B** wird Dispers Rot von **A** abgespalten, wodurch ein Fluoreszenzsignal entsteht. Das fluoreszierende Reaktionsprodukt sollte dabei am POI gebunden bleiben. Die hier gezeigte Templat-gesteuerte Verknüpfungsreaktion sollte diese Voraussetzung erfüllen, da die längeren Reaktionsprodukte eine höhere Affinität zum POI haben als die kürzeren reaktiven Peptide selbst (Abbildung 27, Ausbleiben von Reaktionspfad c).

Als bioorthogonale Verknüpfungsreaktionen kommen die Staudinger-Ligation und die native chemische Peptidverknüpfung in Frage. Bei der Staudinger-Ligation reagiert ein *ortho*-Phosphin-Benzoesäureester mit einem Azid zu einem *ortho*-Phosphin-Benzoesäureamid. Die fluoreszenzlöschende Abgangsgruppe wird hier durch eine intramolekulare Aminolyse der Estergruppe abgespalten. Bei der nativen chemischen Peptidverknüpfung handelt es sich bei den reaktiven Gruppen um die Mercaptogruppe eines Cysteinylopeptids und um einen Thioester, welcher den Thiol-modifizierten Fluoreszenzlöcher trägt. Der Thiol-modifizierte Fluoreszenzlöcher ist hier die Abgangsgruppe. Zuletzt sind beide Peptide über Amid an der Verknüpfungsstelle **Z** miteinander verbunden.

Zur einfacheren Steuerung des Templat-gesteuerten Reaktionsschemas wird auf die E_n - und K_n -Peptide zurückgegriffen. Das E_n -Peptid ist in diesem Model das POI bzw. das Templat. Als reaktive Peptide werden die komplementären K_n -Peptide verwendet (vgl. 2.2.2).

Diese beiden bioorthogonalen Reaktionen bilden gute Möglichkeiten, um ein geeignetes Modellsystem zur Detektion von POIs aufzubauen.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Fluorogene Staudinger Ligation

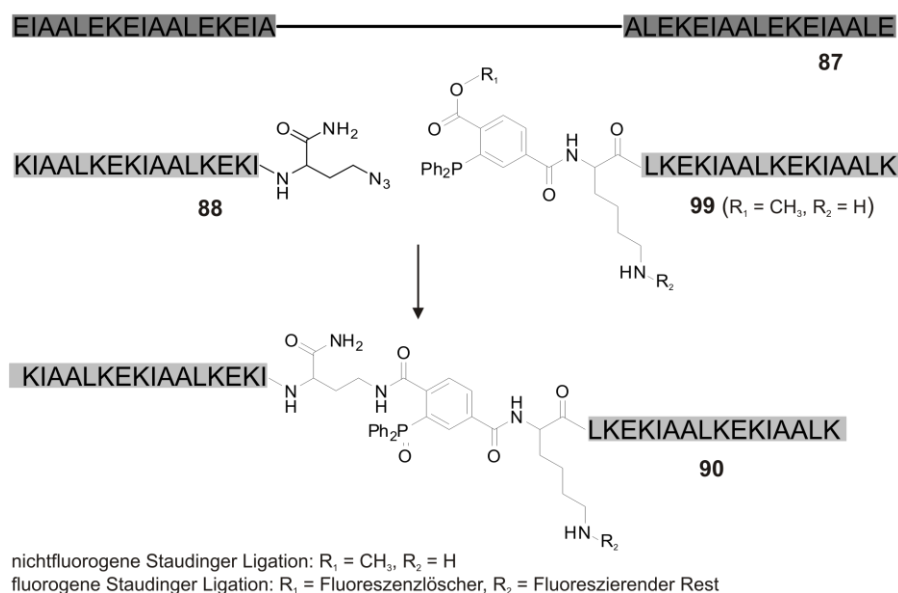


Abbildung 28: Templat-gesteuerte Staudinger-Ligation unter nicht fluorogenen Bedingungen ($R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$) und fluorogenen Bedingungen ($R_1 = \text{Fluoreszenztlöcher}$ und $R_2 = \text{fluoreszierender Rest}$).

Die reaktiven Peptide im Modellsystem werden entsprechend modifiziert, dass die Staudinger-Ligation genauer untersucht werden kann. Ein Azid-modifiziertes Peptid **88** wird mit einem zweiten Peptid **99**, welches einen *ortho*-Phosphin-substituierten Benzoessäureester trägt, zur Reaktion gebracht (Abbildung 28). Peptid **99** kann als R_2 eine Fluoreszenzmarkierung (FAM) und gleichzeitig als R_1 einen Fluoreszenztlöcher (Q) tragen. Letztgenannte Gruppe wird im Zuge der Staudinger-Verknüpfung vom Molekül abgelöst, wodurch ein Fluoreszenzsignal entsteht. Um die Kinetik und die Reaktionsbedingungen zu untersuchen, wurde die Templat-gesteuerte Staudinger-Ligation vorweg ohne Fluoreszenzmarkierung durchgeführt. Das Reaktionsverhalten und die erzielbaren Reaktionsbeschleunigungen sollten damit unter vereinfachten Bedingungen untersucht werden. Das C-terminal Azid-modifizierte Peptid **88** wurde mit dem *ortho*-Phosphinbenzoessäuremethylester-modifizierten Peptid **99** umgesetzt, wobei $R_1 = \text{CH}_3$ und $R_2 = \text{H}$ ist (vgl. Abbildung 28). Die Azidogruppe sollte mit Hilfe von Azidohomoalanin als Monomer in der Festphasenpeptidsynthese in das Peptid eingefügt werden. Durch die manuelle Kupplung von Baustein **93** auf das N-terminale

Lysin sollte das *ortho*-Phosphinbenzoesäuremethylester-modifizierte Peptid **99** dargestellt werden.

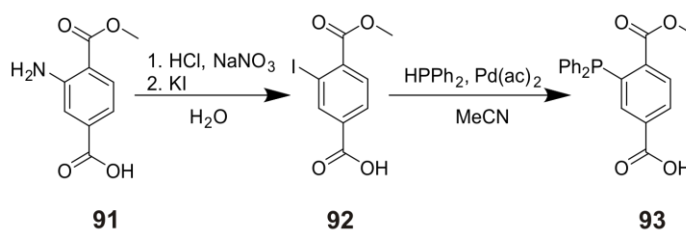


Abbildung 29: Literaturbekannte Synthese von **93**.²³³

Zur Synthese von **93** wurde der kommerziell verfügbare Baustein **91** über eine Sandmeyer-artige Reaktion in den entsprechenden Iodoaromaten **92** überführt (Abbildung 29). Durch anschließende palladiumkatalysierte Knüpfung mit Ph_2PH wird **93** erhalten. Phosphine neigen zur Oxidation an Luftsauerstoff, jedoch konnte durch entsprechende Lagerung unter Argon eine Oxidation von **93** weitgehend unterbunden werden. Die Synthese wurde entsprechend der Literatur durchgeführt.²³³

Zur Synthese des Azidohomoalanin-Peptids **88** (Abbildung 30 A) wurden Fmoc-geschütztes Azidohomoalanin auf ein Rink-Amid-Harz gekuppelt (**88a**). Durch darauf folgende automatisierte Festphasenpeptidsynthese konnte **88** und anschließende Abspaltung vom polymeren Träger erhalten werden. Bei der Abspaltung vom polymeren Träger wurde auf die Zugabe von Silanen verzichtet, um eine Reduktion des alkylierten Azids zu verhindern. Peptid **99** wurde nach der HPLC-Reinigung mit 18% Ausbeute erhalten. Nach der Kupplung des Bausteins **93** auf **98** musste wiederholt festgestellt werden, dass Monomer **93** in der Lagerung oxidationsstabil war, jedoch unter Kupplungsbedingungen erhebliche Tendenzen zur Oxidation zeigte.²⁶³ Während der Kupplung von **93** musste sorgfältig darauf geachtet werden, dass alle Lösungsmittel sorgfältig entgast wurden. Abbildung 30 C bis G zeigen die HPLC-MS-Analysen der unaufgereinigten Reaktionsmischungen unter verschiedenen Reaktionsbedingungen. Die verschiedenen Kupplungsmethoden lieferten neben dem Zielmolekül **99** auch unterschiedliche Mengen der oxidierten Spezies **99(O)**.

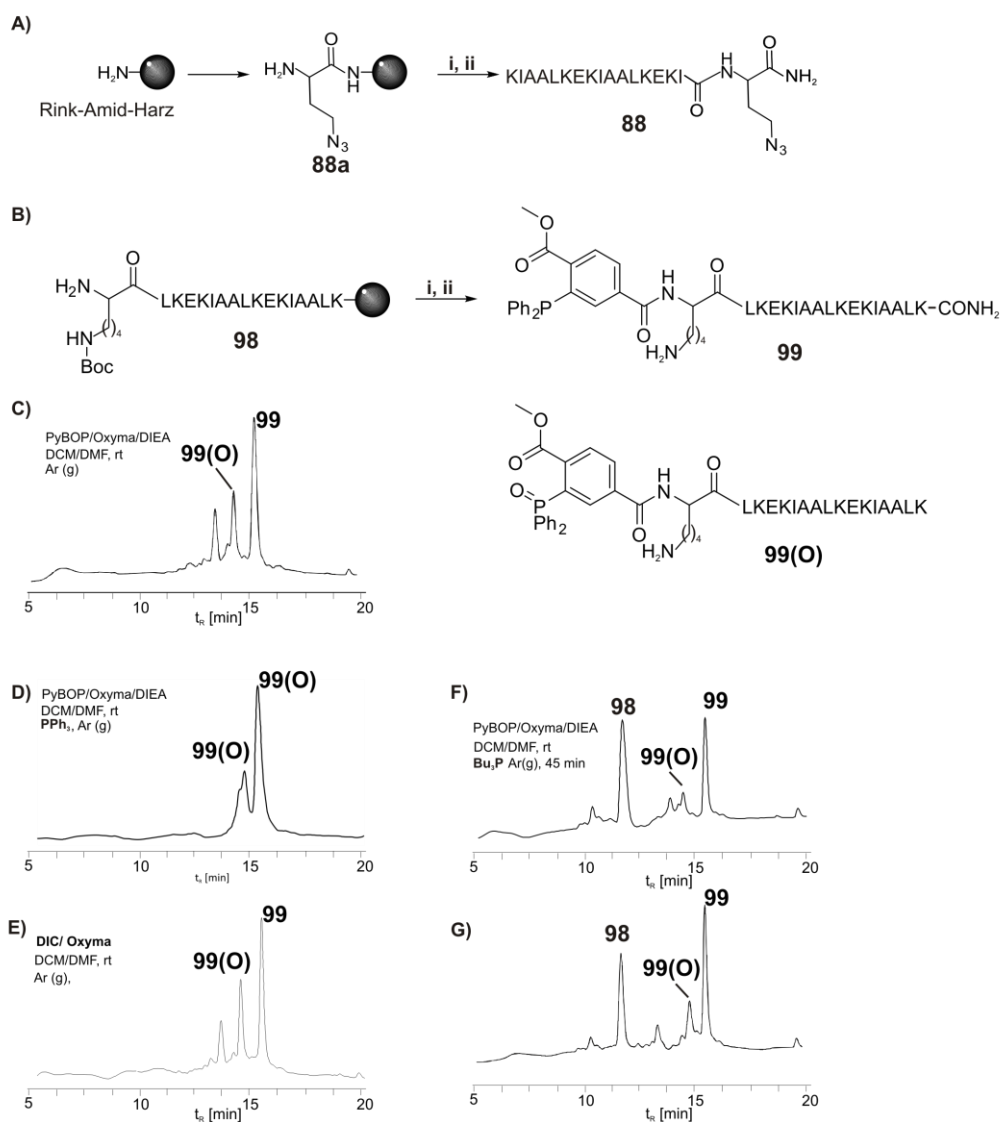


Abbildung 30: **A)** Um **88** zu synthetisieren, wird ein Rink-Amid-Harz mit Azidohomoalanin vorbehandelt. **B)** Finaler Kupplungsschritt des ortho-Phosphin-Benzoeester auf das N-terminale Lysin von **93**. i) Individueller Kupplungsschritt, siehe **C)**-**G)**. ii) Freisetzen vom polymeren Träger mit Hilfe von TFA/TIS/H₂O (96:2:2) und anschließender Präzipitation in Ether. **C)** Kupplungsbedingungen: 4 Äq **93**, 4 Äq PyBOP, 4 Äq Oxyma, 4 Äq DIEA unter Argon in DMF/CH₂Cl₂ (1:1) bei Raumtemperatur. **D)** Kupplungsbedingungen: 4 Äq **93**, 4 Äq PyBOP, 4 Äq Oxyma, 4 Äq DIEA, 8 Äq PPh₃ unter Argon in DMF/CH₂Cl₂ (1:1) bei Raumtemperatur. **E)** Kupplungsbedingungen: 4 Äq **93**, 4 Äq DIC, 4 Äq Oxyma unter Argon in DMF/CH₂Cl₂ (1:1) bei Raumtemperatur. **F)** Kupplungsbedingungen: 4 Äq **93**, 4 Äq PyBOP, 4 Äq Oxyma, 4 Äq DIEA, 8 Äq Bu₃P unter Argon in DMF/CH₂Cl₂ (1:1) bei Raumtemperatur. **G)** Doppelkupplung unter den Bedingungen von **F)**.

Es wurden verschiedene Strategien angewendet, um **93** auf **98** zu koppeln und die angesprochene Oxidation zu verringern. Bei herkömmlichen Kupplungsbedingungen mit der Verwendung von PyBOP und Oxyma als Aktivatoren und DIPEA als Base konnte **99** synthetisiert werden. Allerdings mussten erhebliche Mengen **99(O)** in Kauf genommen werden (Abbildung 30 C). Dies wurde auf die basischen Reaktionsbedingungen zurückgeführt. Da Phosphine im basischen Medium eher zur Oxidation tendieren, sollte die Kupplung von **93** auf **98** unter nicht-basischen

Bedingungen durchgeführt. In einer alternativen Kupplungsmethode wurde Diisopropylcarbodiimid (DIC) verwendet. Carbodiimide können Carbonsäuren in ihrer in protonierten Form aktivieren und **99** konnte unter diesen Bedingungen dargestellt werden (Abbildung 30 E). Die Bildung von **99(O)** konnte allerdings nicht unterbunden werden. Unter den beiden beschriebenen Kupplungsbedingungen konnte **99** in Reinheiten von ca. 55% erhalten werden. Um die Oxidation von **99** zu umgehen, sollten erneut PyBOP und Oxyma als Aktivatoren verwendet werden. Anders als zuvor, wurde nun PPh₃ im Überschuss zur Kupplungslösung gegeben. PPh₃ sollte hierbei als ein sogenanntes „Opferphosphin“ dienen. Zwar konnte **99** erfolgreich dargestellt werden (Abbildung 30 D), aber wiederum entstand **99(O)** im selben Ausmaß wie zuvor ohne PPh₃. Die Zugabe von PPh₃ unterbindet die Oxidation von **99** nicht, da PPh₃ wohl zu resistent gegenüber Oxidation ist. Aufgrund der Alkylreste ist (C₄H₉)₃P ein deutlich stärkeres Reduktionsmittel als das Arylphosphin PPh₃. Der Einsatz von Überschüssen an (C₄H₉)₃P mit PyBOP und Oxyma, als Aktivatoren, ermöglichte die Synthese von **99**. Ein vollständiger Umsatz von **98** konnte, im Gegensatz zu PPh₃, mit (C₄H₉)₃P in der Kupplungslösung nicht erreicht werden (Abbildung 30 F). Allerdings konnte das Ausmaß der Oxidation von **99** durch den Einsatz von (C₄H₉)₃P erfolgreich verringert werden (Ausbeute **99**: 41%). Eine wiederholte Kupplung von **93** ergab unter einem konstanten Ausmaß des Oxidationsprodukts **99(O)** zusätzlich erhöhte Ausbeuten von **99** (Abbildung 30 H, Ausbeute **99**: 55%).

Die um ca. 50% verringerte Ausbeute bei der Kupplung von **93** in Anwesenheit von (C₄H₉)₃P war nicht zufriedenstellend und wurde zum Anlass genommen, Baustein **93** mit einer Schutzgruppe zu versehen. Eine Möglichkeit für eine solche Schutzgruppe sind Borane, die am Phosphin-Phosphor koordinieren können.²⁶⁴

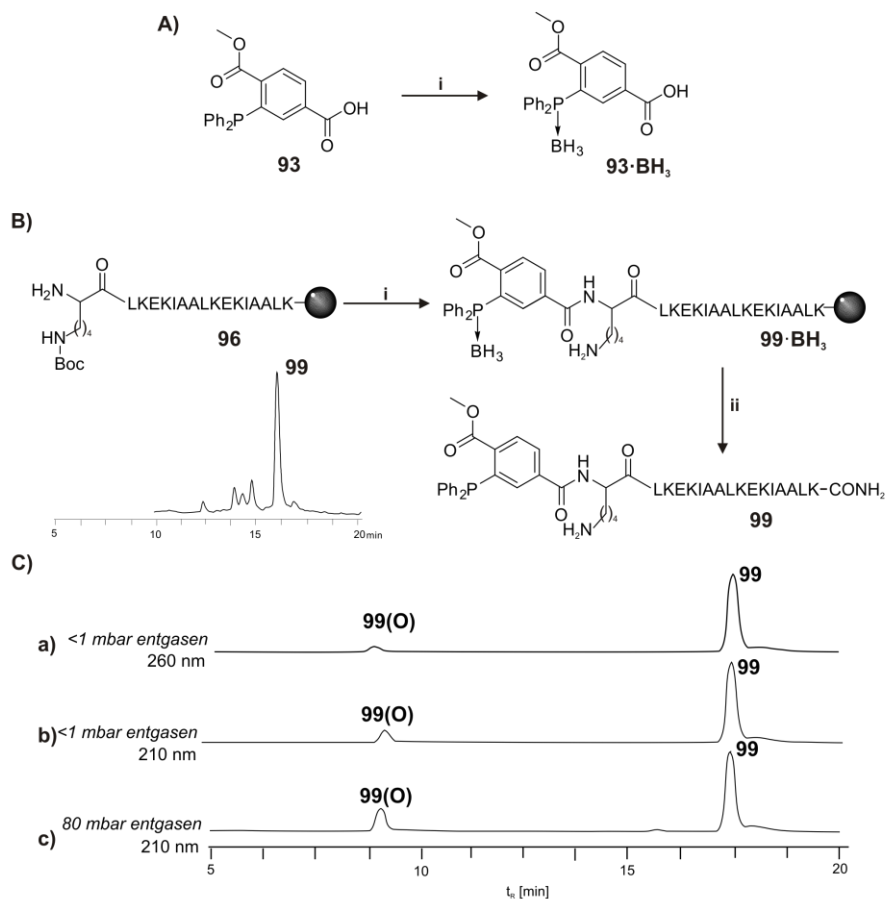


Abbildung 31: **A)** Einführung der Boranschutzgruppe: i) 1.1 Äq $\text{BH}_3 \cdot (\text{CH}_3)_2\text{S}$ in THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{r.t.}$ in 90 min **B)** Finaler Kupplungsschritt des borangeschützten ortho-Phosphin-Benzoeester auf das N-terminale Lysin von **93·BH₃**. i) 4 Äq **93·BH₃**, 4 Äq PyBOP, 4 Äq Oxyma, 4 Äq DIEA unter Argon in DMF/ CH_2Cl_2 (1:1) bei Raumtemperatur. **C)** Aufreinigung von **99** mit unterschiedlich stark entgasen HPLC-Lösungsmittelgemischen zur Aufreinigung: **a)** mit bei < 1 mbar entgasen HPLC-Lösungsmittelgemisch aufgereinigtes **99** (260 nm); **b)** mit bei < 1 mbar entgasen HPLC-Lösungsmittelgemisch aufgereinigtes **99** (210 nm); **c)** mit bei 80 mbar entgasen HPLC-Lösungsmittelgemisch aufgereinigtes **99** (210 nm).

Durch die Zugabe von Dimethylsulfid-Boran-Komplex konnte **93·BH₃** erzeugt werden (Abbildung 31 A). Der so entstandene Phosphor-Boran-Komplex **93·BH₃** zeigte während der Festphasenpeptidsynthese keine Sauerstoffempfindlichkeit mehr. Nach der Kupplung wird der Boran-Komplex, durch die Zugabe von TFA während der Abspaltung des Peptids vom Harz zerstört und **99** erhalten. Die Synthese von **99** gelang dabei mit einer hohen Ausbeute von 88% (Abbildung 31 B). Zur präparativen HPLC-Aufreinigung wurden die Eluenten entgast. Das Entgasen erfolgte am Hochvakuum nach dem *Freeze-Pump-Thaw*-Verfahren. So konnte die Oxidation des Phosphins während der Peptidaufreinigung zwar nicht verhindert, jedoch eingedämmt werden. Für Eluenten, welche bei 80 mbar bzw. < 1 mbar entgast wurden, konnte **99** mit Reinheiten von 88% bzw. 95% isoliert werden (Abbildung 31 C).

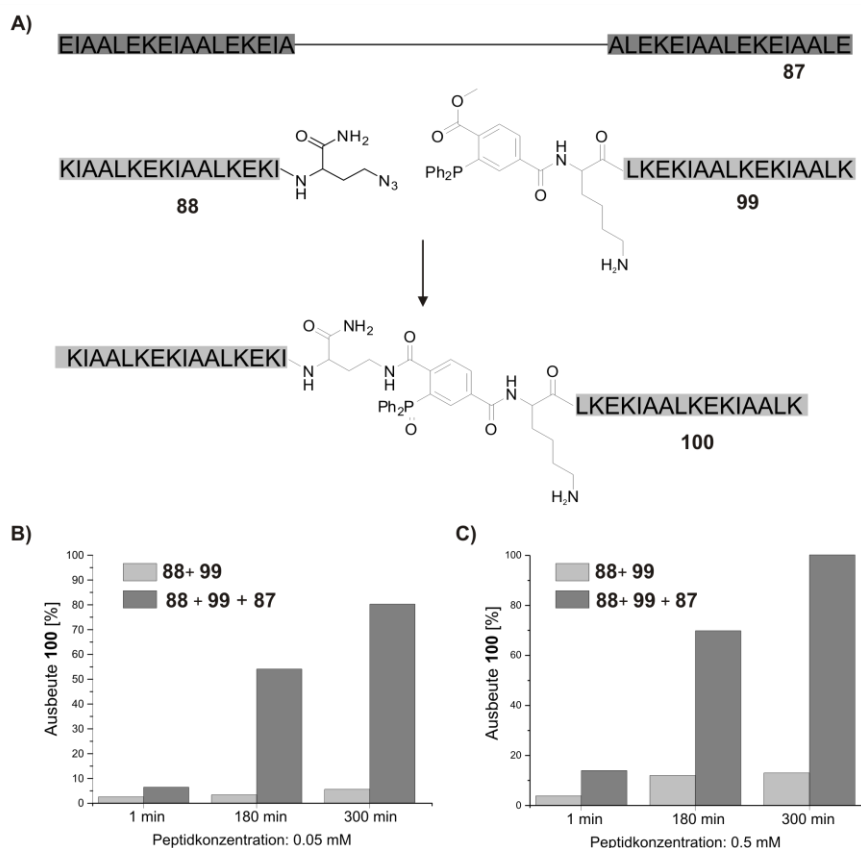


Abbildung 32: A) Die templatgesteuerte Staudinger-Ligation zwischen **88** und **99** ergibt das Ligrationsprodukt **100**. B) Ausbeuten von **100** bei der templatgesteuerten Staudinger-Ligation zwischen **88** und **99** bei 1 min und bei 180 min mit einer Peptidkonzentration von 0.05 mM. C) Ausbeuten von **100** bei der templatgesteuerten Staudinger-Ligation zwischen **88** und **99** bei 1 min und bei 180 min mit einer Peptidkonzentration von 0.5 mM.

Vor der Durchführung der fluorogenen Staudinger Ligation sollen vorerst passende Reaktionsbedingungen für diese Ligrationsmethode gefunden werden. Hierzu wurde die nicht-fluorogene Staudinger-Ligation mit den reaktiven Peptiden **88** und **99** mit und ohne Templat **87** bei Peptidkonzentrationen von 0.5 mM und 0.05 mM durchgeführt (Abbildung 32). HPLC-Analysen der Aliquote bei 180 min zeigen, dass die Staudinger-Ligation zwischen **88** und **99** ohne **87** bei beiden Peptidkonzentrationen 0.5 mM und 0.05 mM mit sehr geringen Ausbeuten von **100** (12% und 3%) abläuft. Diese nicht Templat-gesteuerte Staudinger-Ligation im sub-millimolaren Bereich verläuft sehr langsam. Die Zugabe von 50 mol% des Peptidtemplats **87** zu den reaktiven Peptiden **88** und **99** zeigte eine enorme Erhöhung der Ausbeuten von **100** nach 180 min. So wurde **100** in bei einer Peptidkonzentration von 0.5 mM in einer Ausbeute von 71% erhalten (vgl. 12% ohne **87**) und bei Peptidkonzentration von 0.05 mM mit Ausbeuten von 54% (vgl. 3% ohne **87**). Die Zugabe von 0.5 Äquivalenten von **87** sollte zeigen, dass die Erhöhung der Ausbeuten Templat-gesteuert war und die Reaktionsprodukte am Templat gebunden bleiben. Bei einer Peptidkonzentration von 0.05 mM wurde ein Umsatz von

54% von maximal möglichen 50% erreicht. Bei einer Peptidkonzentration von 0.5 mM wurde der maximale Umsatz von 50% mit 71 % überschritten. Dies kann am Verlust der gewünschten Templat-Kontrolle bei hohen Konzentrationen liegen, wodurch die Hintergrundreaktion schneller ablaufen kann. So gelang es wohl den reaktiven Peptiden bei hohen Peptidkonzentrationen das gebildete Ligationsprodukt **100** vom Templat zu verdrängen. Allerdings wurde bei beiden Peptidkonzentrationen die maximale Ausbeute von 50% nach 300 min deutlich überschritten. Bei der Templat-gesteuerten Staudinger-Ligation vergrößerte sich die Anfangsgeschwindigkeitskonstante der Reaktion um einen Faktor von 65 und sogar um einen Faktor von 360 bei den Peptidkonzentrationen von 0.5 mM bzw. 0.05 mM. Hieraus konnte geschlossen werden, dass auch die Hintergrundreaktion der fluorogenen Staudinger-Ligation bei einer Peptidkonzentration von 50 μ M ausreichend gering sein sollte. Zudem sollte durch die Templat-bedingte Beschleunigung der Reaktion eine genügend hohe Fluoreszenzverstärkung zu beobachten sein.

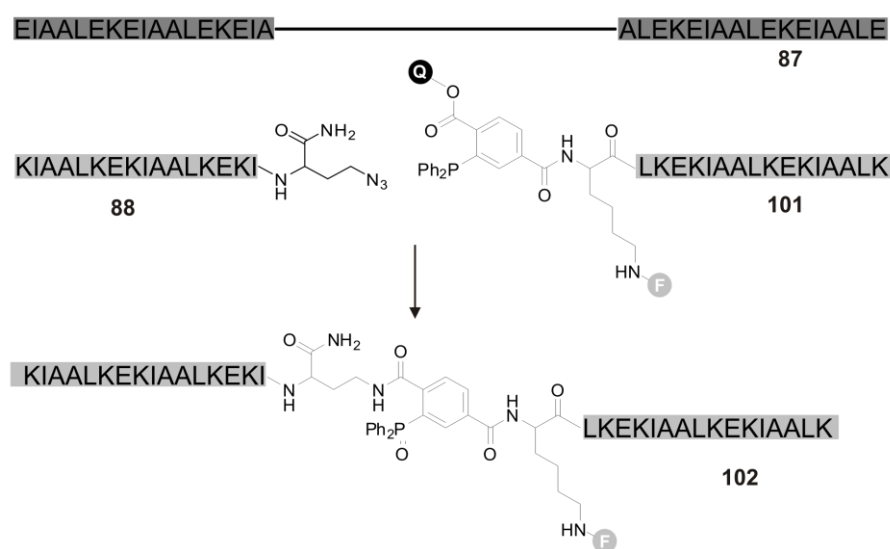
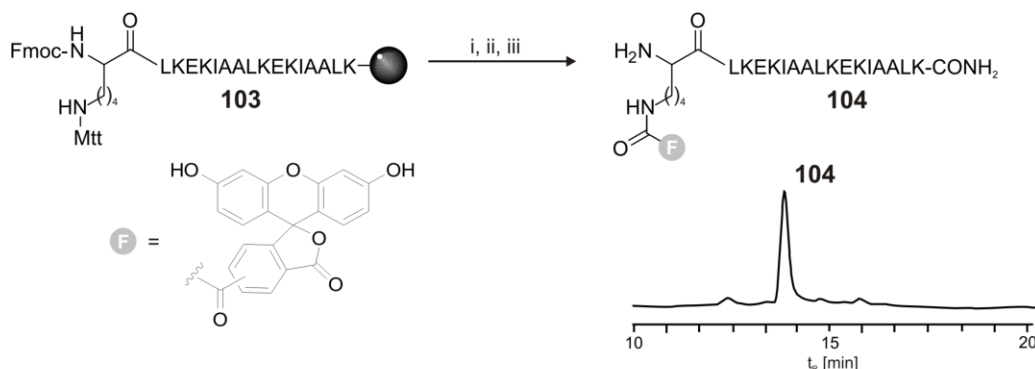


Abbildung 33: Templat-gesteuerte fluorogene Staudinger Ligation zwischen dem Azidohomoalanin modifizierten **88** und **101**, welcher eine Fluoreszenzmarkierung (F) und einen Fluoreszenzlöcher (Q) trägt.

Zur Durchführung der fluorogenen Staudinger-Ligation wurde Peptid **101** als neuer Reaktionspartner benötigt. **101** trägt sowohl ein Fluorophor (F, Abbildung 33) und ein räumlich benachbartes fluoreszenzlöschendes Molekül (Q, Abbildung 33). Als Folge der Staudinger-Ligation verbleibt der Fluorophor im Reaktionsprodukt **102**, wobei das fluoreszenzlöschende Molekül das Peptid als Fluchtgruppe verließ. So soll die Staudinger-Ligation zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignals führen. Mit diesem

System könnte auch die langwierige Durchführung der UPLC-MS-Analysen umgangen werden.

A)



B)

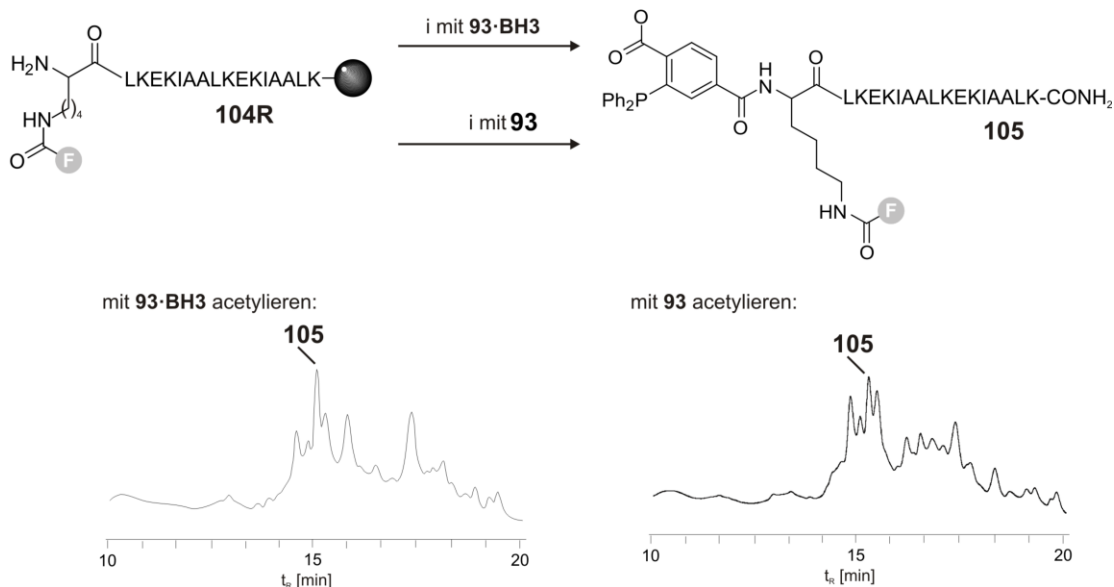


Abbildung 34: A) Modifizierung des ϵ -Amins in **103** durch i) TFA/TIS/DCM (1:1:99), ii) 5/6-Carboxyfluorescein/PyBOP/Oxyma/NMM in DMF und iii) 20% Piperidin in DMF. B) Modifizierung des α -Amin mit i) 5 Äq **93·BH3** oder **93**/PyBOP/ Oxyma/ DIEA in DCM/DMF (1:1), 45min.

Hierzu wurde ein Rink-Amid-Harz mit der Peptidsequenz **103** beladen (Abbildung 34 A). Die Mtt-Schutzgruppe konnte gezielt mit Hilfe 1%iger TFA entfernt werden, wodurch eine orthogonale Deblockierung des ϵ -Amins möglich war. Dieses konnte nun mit 5/6-Carboxyfluorescein acetyliert werden um **104** zu erzeugen (Abbildung 34 A). Die anschließende Fmoc-Entschützung bewirkte die Deblockierung des α -Amins. Zudem wurden im Verlauf der Fmoc-Abspaltung entstehende FAM-Überacetylierungen entfernt. Solche entstehen, wenn Überschüsse von FAM einen Phenolester mit den bereits am ϵ -Amin gekuppelten FAM-Molekülen bilden. Das Chromatogramm der ungereinigten Abspaltmischung zeigte eine ausreichende Reinheit, um direkt mit dem harzgebundenen **104R** in der Festphasensynthese fortzufahren. Anschließend wurden

die Kupplungsbedingungen zur Kupplung eines *ortho*-Phosphinbenzoesäureesters untersucht. Dazu wurde die Synthese des Zielmoleküls **105** genauer untersucht.

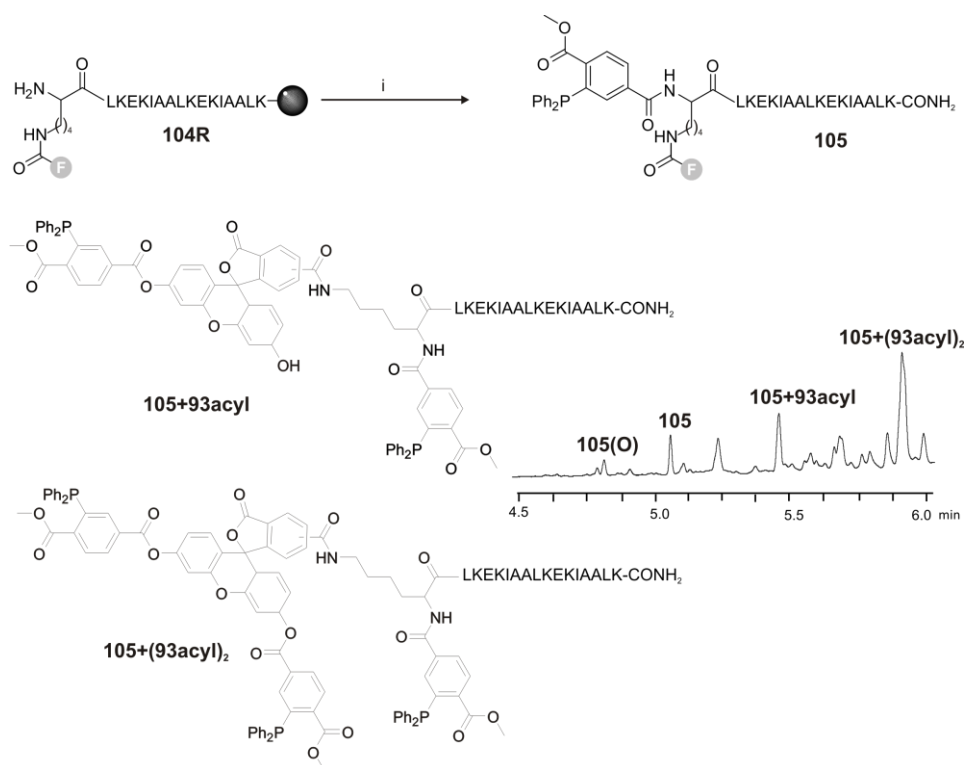


Abbildung 35: Acylierung von **104R** mit **93·BH₃**; i) 3 Äq **93·BH₃**, 3 Äq PyBOP mit DIPEA in DMF, 30 min. Zusätzlich ist das Chromatogramm der nicht aufgereinigten Abspaltlösung gezeigt. Die einfach acetylierte Spezies **105+93acyl** und die zweifach acetylierte Spezies **105+(93acyl)₂** sind ebenfalls gezeigt.

Die Kupplung von **93·BH₃** zeigte einen schlechten Umsatz (Abbildung 34 B). Das gewünschte Produkt konnte zwar im Hauptpeak identifiziert werden. Jedoch wurden erhebliche Mengen an Nebenprodukten beobachtet. Dabei konnte auch die bereits bekannte oxidierte Spezies von **105** (vgl. Abbildung 30) identifiziert werden. Weiterhin konnten doppelt acetylierte Spezies **105** beobachtet werden. Dabei handelte es sich um einen Ester des Phenolalkohols des 5/6-Carboxyfluorescein und **93·BH₃**. Die oxidierte Spezies dieses Phenolesters konnte auch beobachtet werden. Um auszuschließen, dass der schlechte Umsatz durch Boranmodifikation in **93·BH₃** zustande kam, wurde die Acetylierung des α -Amins ein weiteres Mal mit **93** durchgeführt. Das Chromatogramm zeigt keine Verbesserung der Reinheit von **105** in der Acetylierungsreaktion. Die Überacetylierungen wurden als Hauptproblem der Reaktion ausgemacht. Um diese Überacetylierungen zu unterbinden, wurden die Reaktionsäquivalente von **93·BH₃** und den Kupplungsreagenzien von 5 Äquivalenten auf 3 Äquivalente reduziert. Auch die Reaktionszeit wurde von 45 Minuten auf 30 Minuten verkürzt. Bei der Reaktion mit PyBOP als Aktivator konnten sowohl einfach (**105+93acyl**) und zweifach (**105+(93acyl)₂**) acetylierte Spezies von **105** beobachtet werden. Den größten Vorteil

der verringerten Reaktionszeit stellt die deutlich geringere Bildung von **105(O)** dar. (Abbildung 35). Weiterhin wurde untersucht, inwiefern das Waschen des Peptids **105** am Harz mit Piperidin/DMF die ungewünschten Phenolester entfernen kann. Die mehrfach überacetylierten Verbindungen konnten bei den Kupplungen mit PyBOP durch einen einminütigen Waschschrift mit Piperidin/DMF vollständig beseitigt werden ohne ein erhöhtes Auftreten von Oxidationsspezies **105(O)** zu beobachten (Abbildung 36 B).

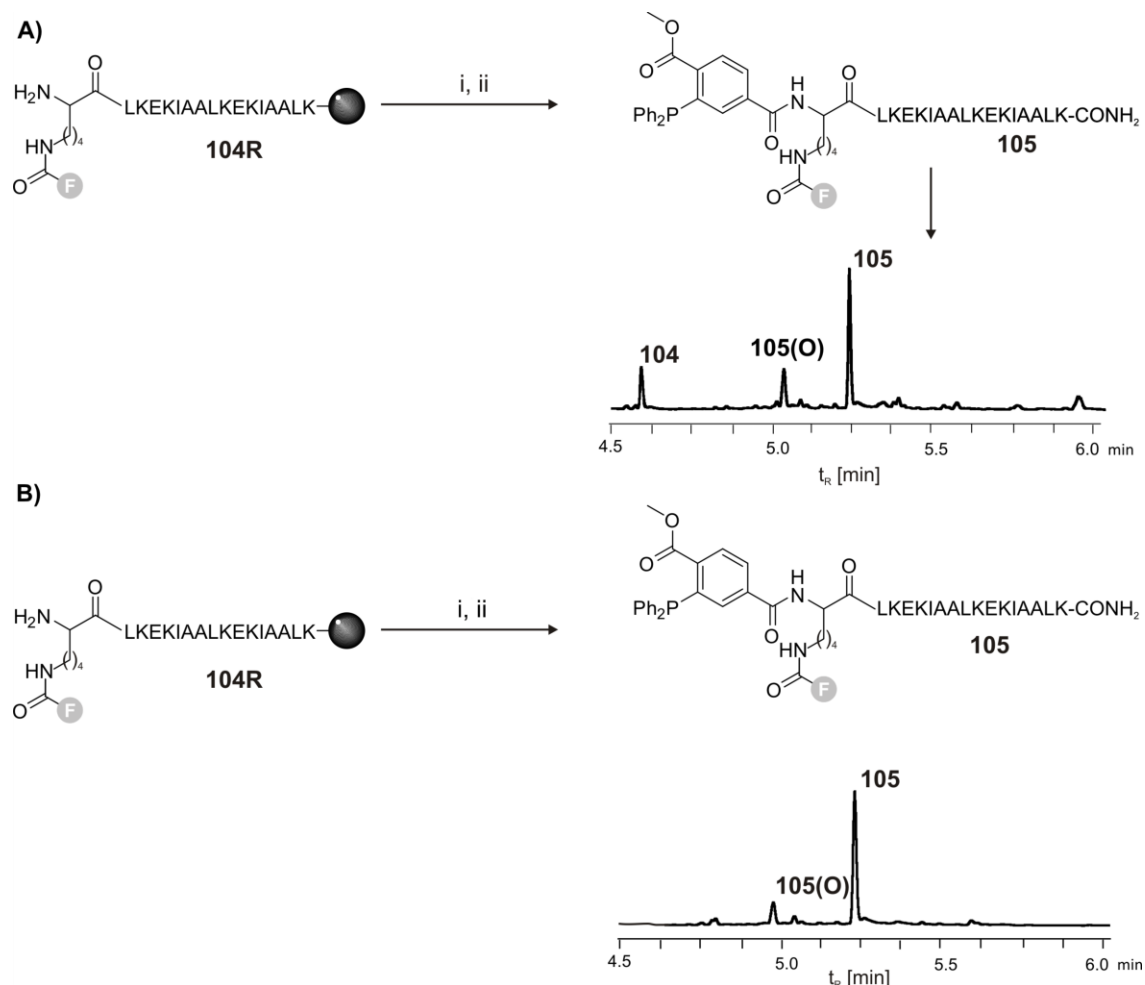


Abbildung 36: A) i) 3 Äq **93·BH₃**, 3 Äq DIC 3 Äq HOBt in DMF für 1h. B) i) 3 Äq **93·BH₃**, 3 Äq PyBOP mit DIPEA in DMF, 30 min wie in Abbildung 35; ii) 1 min Waschung mit 20% Piperidin in DMF.

Die Reduktion von Reaktionsäquivalenten und Reaktionszeiten zeigte bei der Reduktion der Oxidationsspezies **105(O)** gute Ergebnisse. Zusätzlich sollte noch einmal DIC als Kupplungsreagenz verwendet werden. Dabei wurden nun 3 Äquivalente 5/6-Carboxyfluoreszein und entsprechend 3 Äquivalente DIC und HOBt als Aktivatoren verwendet. Die neue Reaktionszeit betrug 1 h. Bei der Verwendung von DIC und HOBt als Aktivator konnten nach 1 h keine Bildung der überacetylierten Spezies beobachtet

werden (Abbildung 36 A). Jedoch konnte hier selbst nach einer Stunde Kupplungszeit immer noch die Anfangsverbindung **104** nachgewiesen werden (Abbildung 36 A). Durch die Aufreinigung von **105** gingen, trotz sorgfältiger Entgasung der Eluenten, große Mengen an **105** verloren. Während der Aufreinigung entstand abermals **105(O)**. Aufgrund des Reaktionsmechanismus der fluorogenen Staudinger-Ligation, ist der Erhalt des freien Elektronenpaares am Phosphor des fluorogenen *ortho*-Phosphinbenzoesäureesters unverzichtbar für den Ablauf der Reaktion zwischen den beiden reaktiven Peptiden. Da im Vorfeld und während dieser Experimente bereits an der Etablierung einer fluorogenen nativen chemischen Peptidverknüpfung gearbeitet wurde, sollte an dieser Stelle die Untersuchungen zur fluorogenen Staudinger-Ligation unterbrochen werden und die NCL als Schlüsselreaktion für dieses Modellsystem genutzt werden.

4.2 Vorarbeiten zur Fluorogenen Nativen Chemischen Peptidverknüpfung

4.2.1 Modellsystem für die fluorogene NCL

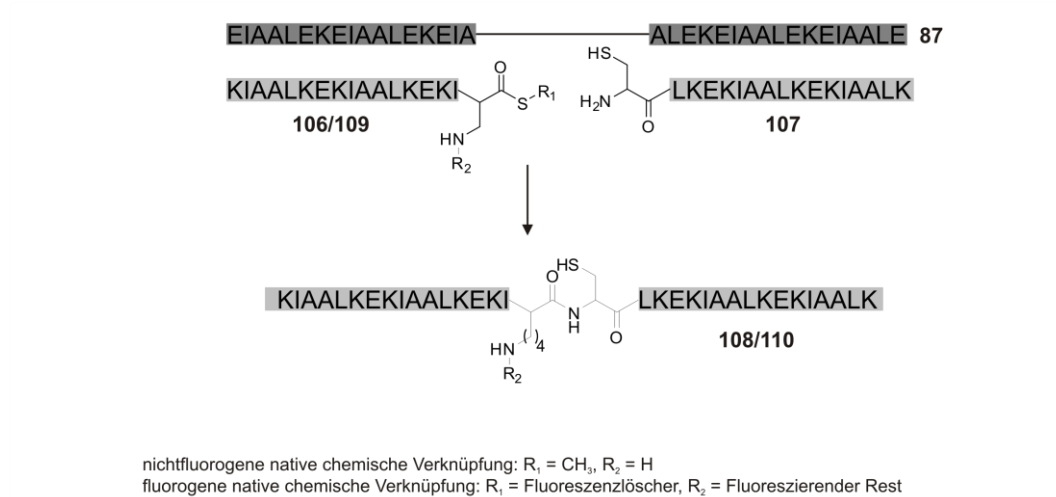


Abbildung 37: Templat-gesteuerte native chemische Peptidverknüpfung unter nicht fluorogenen Bedingungen ($R_1 = (\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{CONH}_2$, $R_2 = \text{H}$) und fluorogenen Bedingungen ($R_1 = \text{Fluoreszenzlöcher}$ und $R_2 = \text{fluoreszierender Rest}$).

Aufgrund des erschwerten Zugangs zum benötigten fluorogenen Peptid in der Staudinger-Ligation wurde die Anwendung einer fluorogenen nativen chemischen Peptidverknüpfung (fNCL) untersucht. Das Prinzip der durch FRET gelöschten Fluoreszenz sollte ebenfalls auf den Mechanismus der NCL übertragen werden. Auch in der fNCL verlässt ein fluoreszenzlöschendes Molekül während der Peptidverknüpfungsreaktion das System. Es sollen ebenfalls Coiled-coil-Peptide verwendet werden, um den Templat-Effekt auszunutzen. So kann ein Thiolderivat des Fluoreszenz-Akzeptor-Farbstoffs als modifizierte Thiolkomponente im Peptidthioester (**106/109**) vorliegen. Weiterhin könnte Lysin als C-terminale Aminosäure des Thioesters ebenfalls ein Carboxyfluorescein tragen. Ein Fluoreszenzanstieg könnte induziert werden, indem der Thioester mit einem Cysteinylpeptid **107** zusammen gebracht wird (vgl. Abbildung 37; $R_1 = \text{Fluoreszenzlöcher}$ und $R_2 = \text{fluoreszierender Rest}$). Die Reaktion zwischen Thioestern (**106/109**) und Cysteinylpeptid **107** erlaubt die Bildung eines neuen Thioester-Intermediats. Dabei verlässt der Thiol-modifizierte Fluoreszenz-Akzeptor den Thioester und ein Fluoreszenzintensitätsanstieg entsteht, da

beide FRET-Partner nun räumlich weit voneinander entfernt sind (Abbildung 37). Dabei entsteht Ligationsprodukt **108/110**.

Wie in Abschnitt 4.1 soll nun die Leistungsfähigkeit der Coiled-coil-Peptide in der NCL überprüft werden (Abbildung 38 A). Hierzu wurde Thioester **106** folgend dem Boc-Protokoll synthetisiert. Das entsprechende Cysteinylpeptid **107** als Reaktionspartner wurde nach der Fmoc-Strategie synthetisiert.

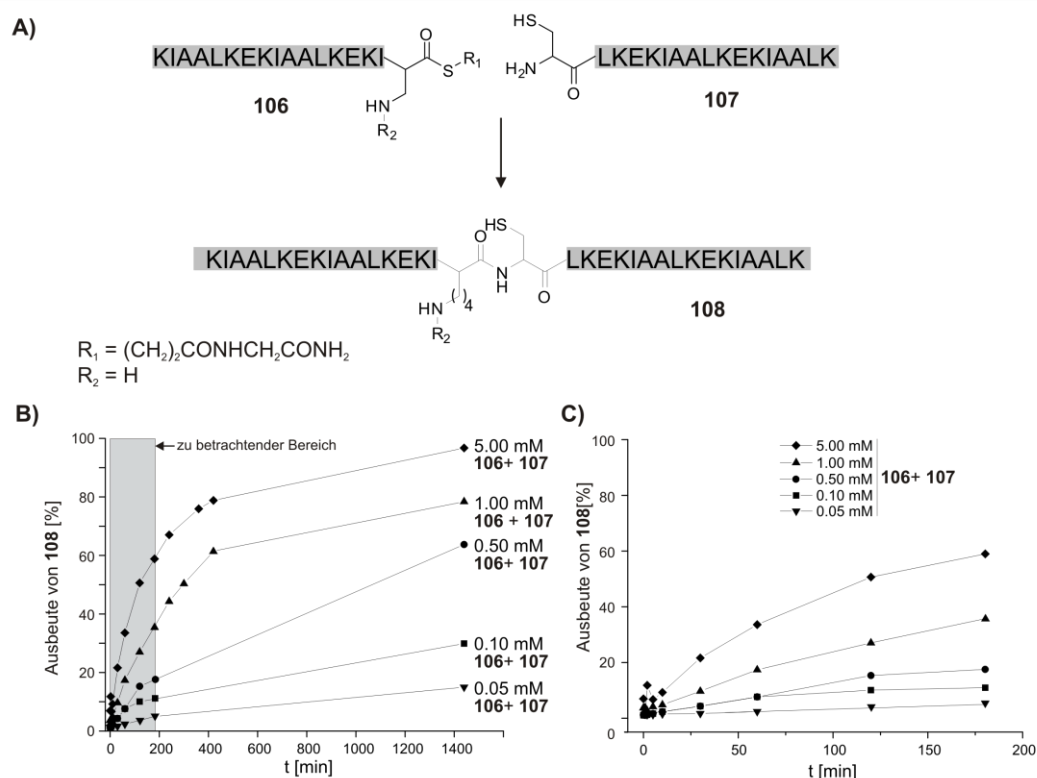


Abbildung 38: **A)** Die native chemische Ligation von Thioester **106** und Cysteinylpeptid **107** bringt Zielpeptid **108** hervor. **B)** Übersicht der Ausbeuten von **108** aus der Reaktion aus A) aus Aliquoten der Reaktion zwischen **106** und **107** bei 5.00 mM, 1.00 mM, 0.50 mM, 0.10 mM und 0.05 mM zu unterschiedlichen Reaktionszeiten vom 0 min bis 1440 min. **C)** Detaillierte Darstellung der Ausbeuten von **108** in den Reaktionsaliquoten zu 0 min, 0.5 min, 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min und 180 min.

Die NCL zwischen den reaktiven Peptiden **106** und **107** wurde bei Peptidkonzentrationen von 5 mM, 1 mM und 0.5 mM, 0.1 mM und 0.05 mM durchgeführt. Die HPLC-Analyse der entnommenen Aliquote bei 180 min zeigen, dass das Ligationsprodukt **108** mit 59% Ausbeute bei einer untersuchten Peptidkonzentration von 5 mM gebildet wurde. Wie erwartet, verläuft die Reaktion bei sub-millimolaren Konzentrationen sehr langsam ab. Die geringste Peptidkonzentration, die eine UPLC-MS-Analyse ohne eine Aufkonzentration erlaubte, war 50 μ M. Bei dieser Konzentration wurden lediglich 5% Ausbeute nach 180 min erreicht (Abbildung 38 B). Deswegen sollte bei dieser Konzentration der Templat-Effekt untersucht werden.

Annähernd quantitative (97%) Ausbeuten von **108** konnte allein bei einer Peptidkonzentration von 5 mM zu einem Zeitpunkt von 1440 min (24 h) beobachtet werden (Abbildung 38 B). Das machte deutlich, dass ohne anwesendes Templat nur durch hohe Peptidkonzentrationen und lange Reaktionszeiten zufriedenstellende Ausbeuten erzielt werden konnten.

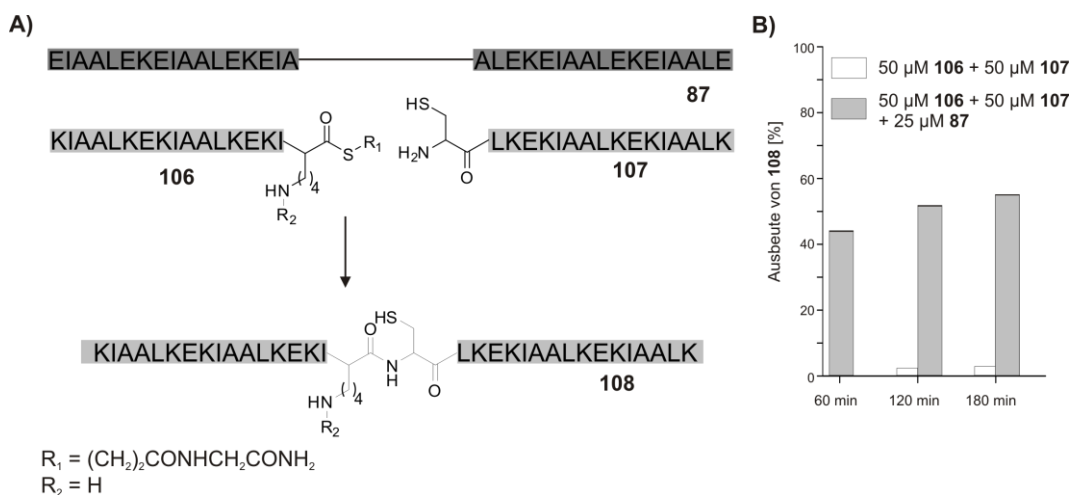


Abbildung 39: **A)** Die native chemische Ligation von Thioester **106** und Cysteinylpeptid **107** in Anwesenheit von Templat **87** bringt Zielpeptid **108** hervor. **B)** Übersicht der Ausbeuten von **108** aus der NCL von **106** und **107** in Abwesenheit von **87** (vgl. Abbildung 38 C) und in Anwesenheit von **87**.

Die Zugabe von 0.5 Äquivalenten Templat **87** zu den reaktiven Peptiden **106** und **107** bei einer Peptidkonzentration von 50 μM (Abbildung 39 A) führte zu einer starken Erhöhung der Reaktivität (Abbildung 39 B). Schon nach 60 min wurden 40% Ligationsprodukt **108** gebildet. Der maximale Umsatz von 50% wurde bereits nach 180 min erreicht. Bei einer Zugabe von 0.5 Äquivalenten des Templats **87** entspricht der 50%-ige Umsatz einer quantitativen Ausbeute bei der Templat-gesteuerten Reaktion. Vergleichbare Ausbeuten ohne Templat **87** konnten nur bei einer Peptidkonzentration von 5 mM **106** und **107** erzielt werden (Vgl. Abbildung 38 B). Bei der Peptidkonzentration von 50 μM konnte die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Reaktion zwischen **106** und **107** in Anwesenheit von **87** verglichen zur Abwesenheit von **87** um einen Faktor von 53 erhöht werden. Dies war ein ausreichend großes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (1:10 bei 180 min) und kann somit auf das neue System der fluorogenen NCL angewendet werden.

4.2.2 Synthese eines fluoreszenzlöschenden Thiols

Für die fNCL wird ein Fluoreszenz-löschendes Thiol benötigt. Hierfür wurde ein bereits kommerziell erhältlicher Farbstoff modifiziert (Abbildung 40). Ein Thiol-tragender Alkyllinker konnte direkt mit dem Farbstoff verknüpft werden. Als Farbstoff wurde Dispers Red 1 (**111**) verwendet (vgl. Abbildung 20). Startverbindung **111** hat sein Absorptionsmaximum bei 502 nm und deckt als Fluoreszenzlöcher den Emissionsbereich von 5/6-Carboxyfluoreszein ab. So kann **111** mit Trityl-3-Mercaptopropionsäure nach Steglich²⁶⁵ verestert werden. Die anschließende Entfernung der Tritylschutzgruppe von **112** erfolgte unter sauren Bedingungen durch die Behandlung mit 20% TFA in Dichlormethan unter der Zugabe von Triisopropylsilan als Kationenfänger. Für eine schnelle Reaktion wurde Triisopropylsilan im Überschuss hinzugefügt, da die Mercaptogruppe in **HSQ** auch unter sauren Bedingungen immer noch nukleophil am Triphenylmethankation angreifen kann.

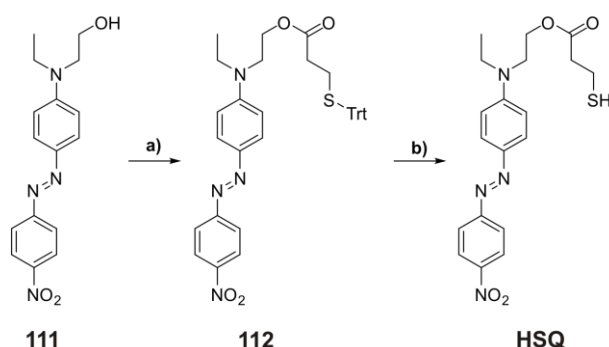


Abbildung 40: a) Trt-S-(CH₂)₂COOH, EDC·HCl, DMAP in DMF, 16 h, 91 %, b) 20 % TFA in DCM, TIS, 60 min, quant.

Im folgenden Abschnitt wird die Anwendung des Fluoreszenz-löschenden Thiols **HSQ** in der Anwendung der fNCL an einem Modellsystem beschrieben.

4.3 Weiterführung und Anwendung der fluorogenen nativen chemischen Ligation

4.3.1 Synthese eines fluorogenen Thioesters

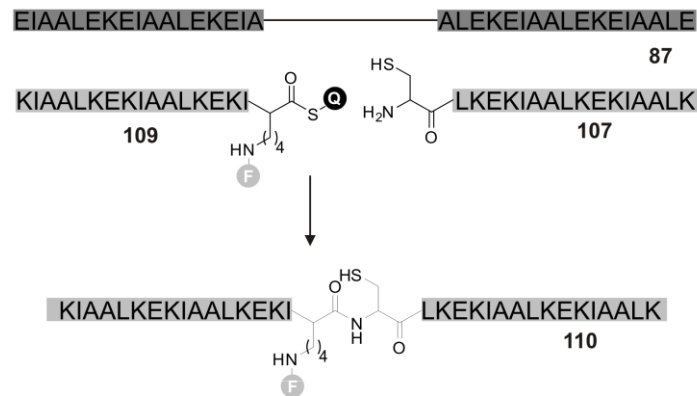


Abbildung 41: Die Templat-gesteuerte NCL zwischen den fluorogenen Thioester **109** und dem Cysteinylpeptid **107** bringt das Reaktionsprodukt **110** hervor.

Im folgenden Abschnitt soll die Durchführung der fNCL demonstriert werden. Der fluorogene Thioester **109** steht im Zentrum der fNCL (Abbildung 41). Um die Funktion der fluorogenen NCL zu demonstrieren, wird wieder das in 4.2.1 etablierte Modellsystem angewendet. Für die fNCL diene **107** erneut als Cysteinylpeptid und **109** als fluorogener Thioester. Zur Synthese von **109** wurde die Thioestersynthese nach Fmoc-Strategie mit Selbstreinigung angewendet (Abbildung 42).

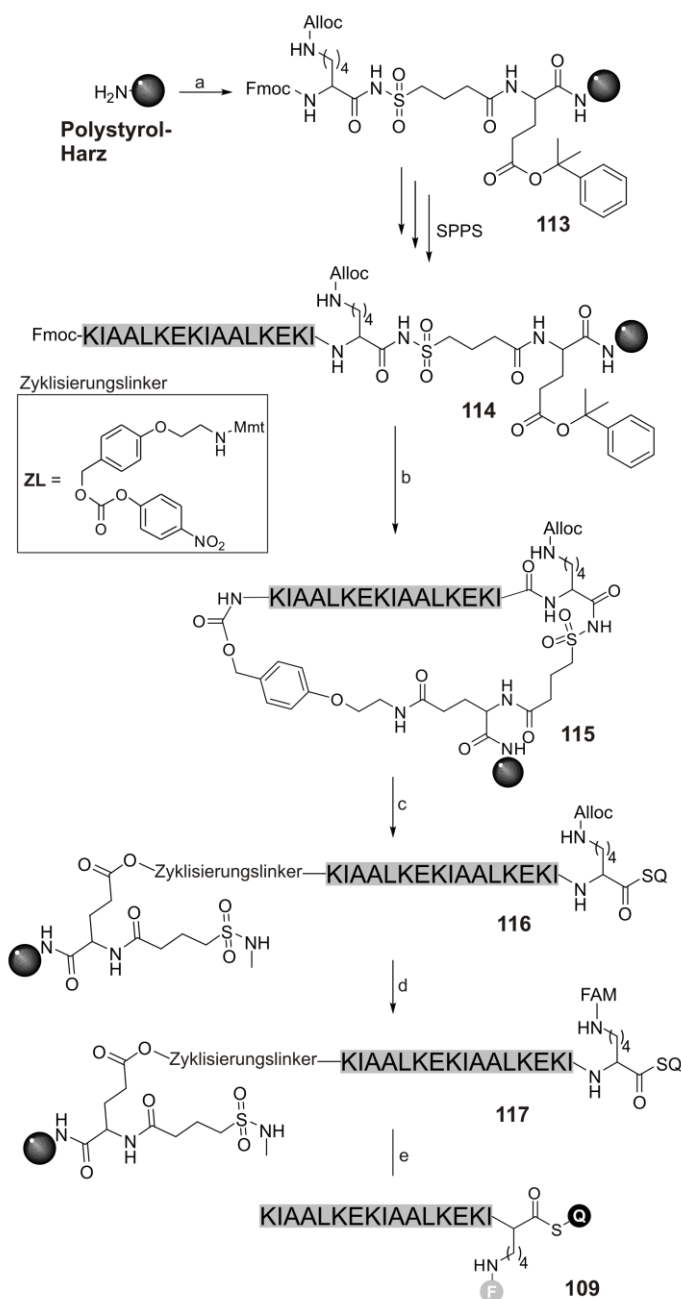


Abbildung 42: Festphasenpeptidsynthese des fluorogenen Peptidthioester mit selbstreinigenden Effekt. a) (i) 2 Äq Fmoc-Glu(PhiPr)-OH, 1.8 Äq HATU, 2 Äq OxymaPure, 4 Äq DIPEA in DMF; (ii) 2.7 Äq 4-sulfamoylbutyric acid, 2.7 Äq DIC, 2.7 Äq HOBt in DMF; (iii) 1 Äq Fmoc-Lys(Alloc)-OH, 1 Äq PyBOP, 3 Äq iPr₂NEt in HCCl₃; b) (i) Piperidin/DMF (1:4), (ii) 10 Äq Zyklisierungslinker (ZL) in DMF/iPr₂NEt 95:5, (iii) 1% TFA in CH₂Cl₂, (iv) 8 Äq PyBOP, 8 Äq HOBt, 24 Äq iPr₂NEt; c) (i) 1 M TMS-CH₂N₂ in Hexan/THF (1:1); (ii) 50 Äq **HSQ** (1 M), 3 Äq NaSPh in DMF; d) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, FAM-COOH, HOBt, DIC in DMSO; e) TFA/TIS/H₂O.

Diese Methode bietet mehrere Vorteile. Es besteht die Möglichkeit der einfachen Modifikation der Peptidseitenketten am C-Terminus des Harz-gebundenen Peptids zu einem Zeitpunkt an dem sich die Orientierung dieses Peptids am Harz umkehrt (von C- zu N-Orientierung nach N- zu C-Orientierung). So liegt der C-Terminus schließlich besser zugänglich und sterisch ungehindert am Harz gebunden. Durch die freie Wahl

von Fluorophor und Fluoreszenzlöcher ist diese Synthese sehr flexibel. Die selbstreinigende Peptidsynthese bietet eine einfache Aufreinigung der Peptide, da Abbruchsequenzen und auch Überschüsse des verwendeten fluoreszenzlöschenden Thiols nach der Thiolyse durch Waschschrte vom Harz-gebundenen Zielpeptids abgetrennt werden können. Der FAM-markierte Thioester **109** (Abbildung 42) wurde synthetisiert, indem Polystyrol-Harz mit Fmoc-Gly-OH und Fmoc-Glu(PhiPr)-OH beladen wurde. Die Kupplung von 3-Carboxysulfonamid-Propionsäure und Fmoc-Lys(Alloc)-OH ergab das beladene Ausgangsharz **113** als Grundlage für die automatisierte Festphasenpeptidsynthese.

Fmoc-Lys(Alloc)-OH stellt eine orthogonal geschützte Seitenkette bereit, welche bei der Einführung von 5/6-Carboxyfluoreszein zu einem späteren Zeitpunkt der Synthese Anwendung findet. Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese lieferte **114** in einer Ausbeute von 72% (bestimmt durch Fmoc-Monitoring). Nur so kann die Stärke der selbstreinigenden Peptidsynthese zum tragen kommen. Der Kupplung von **ZL** als letzten Kupplungsschritt folgte die finale Fmoc-Entschützung. Durch die sorgfältige Durchführung der Capping-Schritte wurde sichergestellt, dass **ZL** lediglich auf die Vollängenpeptidsequenz gekuppelt werden konnte. Anschließend wurden die äußerst säurelabilen Mmt- und PhiPr-Schutzgruppe mit Hilfe von 2% TFA in DCM entfernt. Das nun freie Amin des Zyklisierungslinkers wurde danach mit der ebenfalls freien Carbonsäure des Harz-ständigen Glutamins mit PyBOP an das Harz verankert, um **115** zu erhalten. Nach der Zyklisierung wurde das Harz-gebundene Acylsulfonamid mit dem Alkylierungsreagenz Trimethylsilyldiazomethan behandelt. Das nun aktivierte N-methylierte Acylsulfonamid wurde mit großen Überschüssen des Thiol-modifizierten Fluoreszenzlöschers **HSQ** in Gegenwart von Natriumthiophenolat behandelt, um **116** zu erhalten. Der folgende Waschschrte entfernte den Überschuss von **HSQ** und α -N-acetylierte Abbruchsequenzen, welche nicht mit dem Zyklisierungslinker reagieren konnten und so durch die Thiolyse vom Harz abgespalten wurden. Das C-terminale Lysin sollte an dieser Stelle mit Fluorescein modifiziert werden. Das Lys(Alloc) in **116** wurde mit Hilfe von Palladium von der Alloc-Schutzgruppe befreit, um die Acetylierung des freien ϵ -amins zu ermöglichen (Abbildung 43 A). Der Versuch, FAM mit dem ϵ -Amin in Anwesenheit von PyBOP und Base zu verknüpfen, führte zu einer quantitativen Bildung des ϵ -Lactam **109Lac** (Abbildung 43 B).

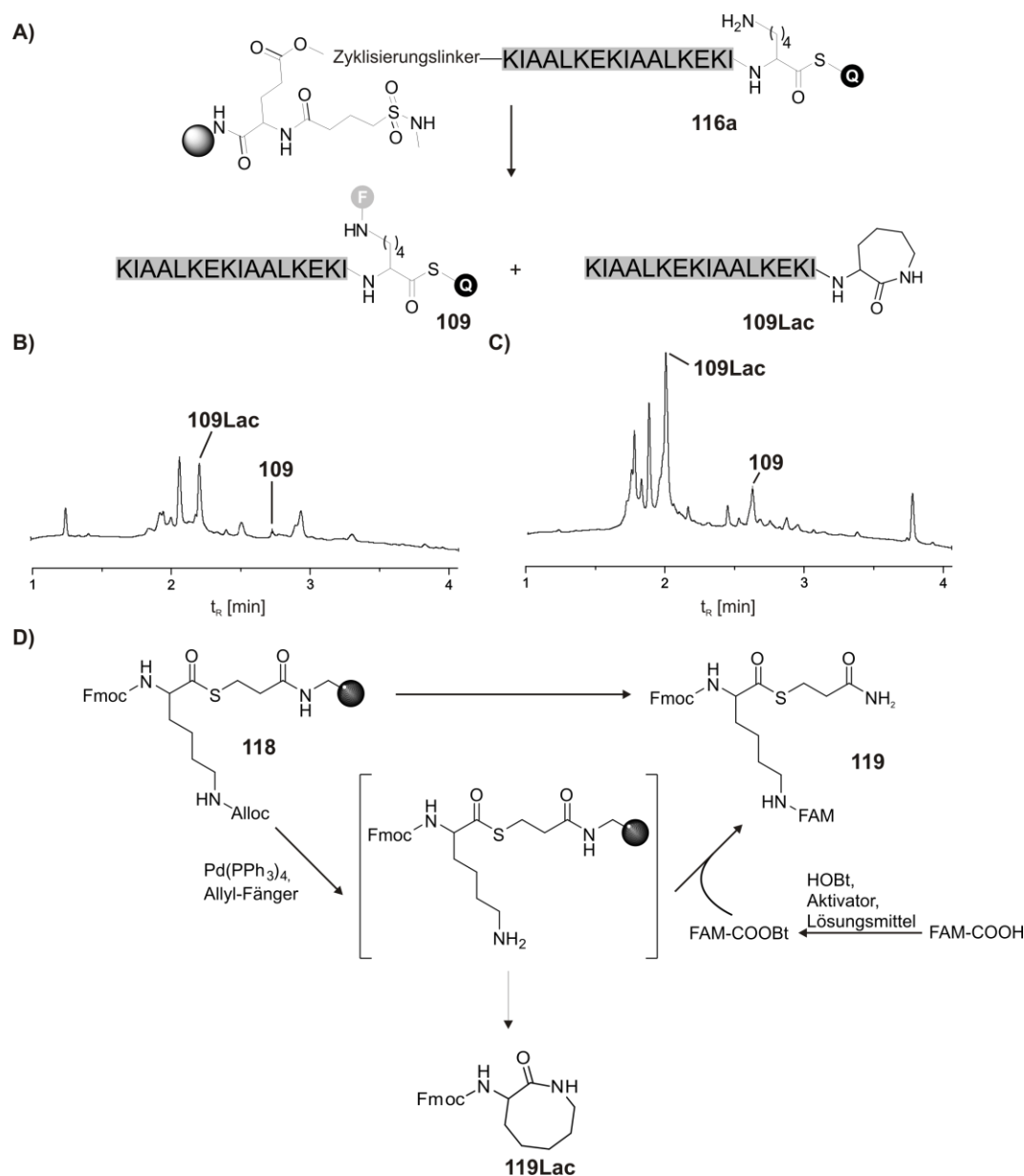


Abbildung 43: **A)** Kritischer Schritt in der Festphasenpeptidsynthese des fluorogenen Peptidthioesters mit selbstreinigenden Effekt. **B)** Chromatogramm der ungereinigten Abspaltung von der Acetylierung von **116a** mit 3 Äq 5/6-Carboxyfluoreszein mit 3 Äq PyBOP, 6 Äq DIPEA. **C)** Chromatogramm der ungereinigten Abspaltung von der Acetylierung von **116a** mit 1.5 Äq 5/6-Carboxyfluoreszein mit 1.5 Äq DIC. **D)** Aufbau eines Modellsystems um die optimalen Bedingungen der Tandem-Entschützungs-Kupplungs-Strategie.

Der Versuch, FAM mit Hilfe des Carbodiimids DIC auf das ϵ -Amin zu kuppeln (Abbildung 43 A), verhinderte den nukleophilen Angriff des ϵ -Amins am Thioester nur teilweise (Abbildung 43 C). Die Ausbeuten des gewünschten Thioester **109** waren mit 3% bei PyBOP und mit 8% bei DIC als Aktivator sehr gering. Es wurde festgestellt, dass das Nebenprodukt **109Lac** direkt nach der Alloc-Entschützung gebildet wurde. Aus diesem Grund sollte eine Tandem-Entschützungs-Kupplungs-Strategie²⁶⁶ angewendet werden. Um die Durchführbarkeit dieser Methode zu überprüfen, wurde ein Modell-Thioester auf ein MBHA-Harz gekuppelt (**118**, Abbildung 43 D). Dieser soll die

chemischen Eigenschaften von **116a** simulieren. Trt-Mercaptopropionsäure wurde auf ein AM-MBHA-Harz gekuppelt. Nach Entfernen der Trt-Schutzgruppe wurde das freie Thiol mit Fmoc-Lys(Alloc)-OH acetyliert, um **118** (Abbildung 43 D) zu erhalten. Die Tandem-Entschützung-Kupplungs-Strategie²⁶⁶ sollte die gleichzeitige Entschützung der Alloc-Schutzgruppe und Acetylierung des in-situ freiwerdenden ϵ -Amins ermöglichen.

Tabelle 1: Übersicht der Ausbeuten von **119** bei der Modifizierung von **118** mit unterschiedlichen Allyl-Kationenfänger, Aktivatoren und Lösungsmitteln.

Eintrag	Allyl-Kationenfänger	Aktivator	Lösungsmittel	Ausbeute 119 [%]
1	PhSiH ₃	DIC	DMF	0
2	PhSiH ₃	DIC	NMP	94
3	PhSiH ₃	DIC	DMSO	95
4	PhSiH ₃	EDCHCl	DMF	0
5	PhSiH ₃	EDCHCl	NMP	25
6	PhSiH ₃	EDCHCl	DMSO	94
7	DMBA	DIC	DMF, NMP, DMSO	0
8	DMBA	EDCHCl	DMF	0

Für die Reaktionslösung wurden verschiedene Allylfänger, Aktivatoren und Lösungsmittel untersucht. Es zeigte sich, dass DMF nicht als Lösungsmittel geeignet war, da die gewünschte Modell-Zielstruktur **119** nicht nachgewiesen werden konnte (Tabelle 1 Eintrag 1, 4, 7, 8). Scheinbar wurde unabhängig von den verwendeten Lösungsmitteln die Acetylierungsreaktion von 1,3-Dimethylbarbitursäure (*1,3-Dimethylbarbituric acid*, DMBA) als Allylscavenger unterbunden (Tabelle 1, Eintrag 7, 8). Als effektivster Aktivator stellte sich Diisopropylcarbodiimid (DIC) anstelle von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC·HCl) heraus. Er lieferte in den Lösungsmitteln NMP und DMSO Ausbeuten von **119** von 94% und 95% (Tabelle 1 Eintrag 2, 3). Aufgrund des geringen Ausmaßes an Überacetylierungen stellte sich DMSO als optimales Lösungsmittel heraus (Tabelle 1, Eintrag 3, 6). Die Überacetylierungen konnten entstehen, wenn FAM-COOH bei der Acetylierung im Überschuss verwendet wurde. FAM-COOH kann mit den phenolischen FAM-OH-Gruppen reagieren und Phenolester bilden. Die Behandlung mit Base zur Beseitigung der Phenolester kann hier keine Anwendung finden, da der Thioester selbst basenlabil ist. PhSiH₃ störte die Acetylierung des ϵ -Amins dagegen nicht und die Aktivierung von

EDC·HCl führte in keinen der gewählten Lösungsmittel zu besseren Ausbeuten von **119**. Abschließend konnte **109** erfolgreich unter den hier gefundenen Bedingungen aus Tabelle 1 Eintrag 3 mit einer Ausbeute von 57% gewonnen werden (Abbildung 42).

4.3.2 Durchführung der fluorogenen nativen Peptidverknüpfung (fNCL)

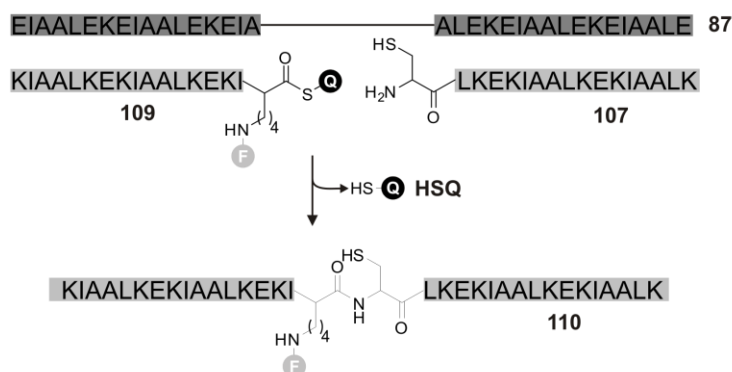


Abbildung 44: Templat-gesteuerte fluorogene native chemische Peptidverknüpfung mit dem Thioester **109** und Cysteinylopeptid **107**.

In den folgenden Experimenten soll die fNCL mit dem Peptidthioester **109** wie in Abschnitt 4.2.1 mit Cysteinylopeptid **107** durchgeführt werden (Abbildung 44). Um die Vergleichbarkeit zu bewahren, wurde die Reaktion ebenfalls bei einer Peptidkonzentration von 50 μ M durchgeführt. Eine quantitative Hydrolyse wurde herbeigeführt, indem **109** mit NH_4OH behandelt wurde. Die Fluoreszenzintensität des erhaltenen Hydrolyseprodukts definierte die maximale Fluoreszenzintensität bei dieser fNCL. Dabei wurde eine 39-fache Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei 525 nm, verglichen mit der Fluoreszenzintensität von **109** allein, beobachtet (Abbildung 45 A).

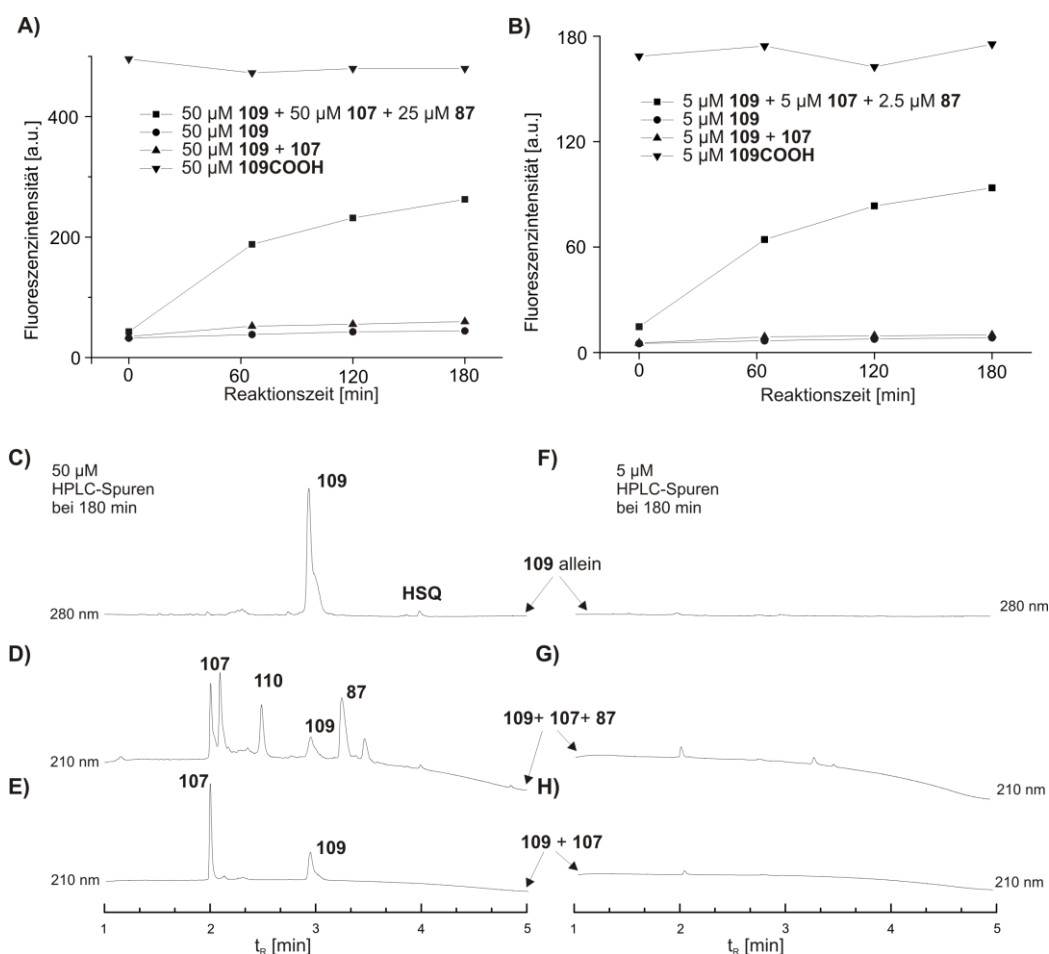


Abbildung 45: Die Fluoreszenzintensität wurde bei 525 nm bestimmt. **A)** Übersicht der NCL zwischen Peptidthioester **109** und Cysteinylopeptid **107** unter der Verwendung von **87**. **B)** Fluoreszenzintensitäten der Reaktion von **109** mit **107** in An- und Abwesenheit von **87** bei einer Peptidkonzentration von 50 µM. HPLC-Spur von **C)** 50 µM und **F)** 5 µM **109** im Reaktionspuffer nach 180 min. HPLC-Spur der Reaktion von **109** mit **107** in Anwesenheit von **87** bei einer Peptidkonzentration von **D)** 50 µM und **G)** 5 µM. HPLC-Spur der Reaktion von **109** mit **107** bei einer Peptidkonzentration von **E)** 50 µM und **H)** 5 µM.

Das bedeutet, dass die Fluoreszenzlöschung von Thiol **HSQ** effizient genug war, um eine NCL mit Hilfe der Fluorometrie zu verfolgen. Die Stabilität des Peptidthioesters wurde untersucht, indem das Fluoreszenzsignal von **109** über 180 min im Reaktionspuffer verfolgt wurde (Abbildung 45 A). Die Fluoreszenzintensität zeigt die Bildung von 3.5% Hydrolyseprodukt an. Dies stimmt in einem abgeschätzten Fehlerbereich mit dem Ausmaß der Hydrolyse von 2% überein, welche durch die UPLC-MS-Analyse des Aliquots bei 180 min bestimmt wurde (vgl. Abbildung 45 D und C). Die nicht Templat-gesteuerte NCL zwischen **109** und **107** zeigte bei 180 min eine Fluoreszenzintensität, welche einer Ausbeute von 5% von **110** entsprach (Abbildung 45 A). Die Analyse des entsprechenden Aliquots mit Hilfe der UPLC-MS zeigte eine Ausbeute von 3% an (Abbildung 45 E). Diese Ausbeute stimmte mit der durch die Fluorometrie bestimmten Ausbeute überein. Ein erheblicher Anstieg der

Fluoreszenzintensität wurde nach Zugabe von 0.5 Äquivalenten von Templat **87** beobachtet (Abbildung 45 A). In der UPLC-MS-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass dieser Anstieg mit der Bildung des Ligationsprodukts **110** zusammenhängt. Hier konnte eine Ausbeute von 50% von **110** (entspricht 100% der Maximalausbeute) bestimmt werden (Abbildung 45 D). Die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 180 min entspricht einer Ausbeute von 48% von **110** (Abbildung 45 A). Gerade bei einer Peptidkonzentration von 5 μ M wird der Vorteil der Fluorometrie gegenüber der UPLC-MS deutlich hervor. Auch hier wurden Peptid **109** und **107** zur Reaktion gebracht. Bei einer Reaktion zwischen **109** und **107** konnte mit Hilfe der UPLC-MS in Anwesenheit (Abbildung 45 G) und Abwesenheit (Abbildung 45 H) kein Reaktionsprodukt **110** nachgewiesen werden. Das Signal ist nicht mehr vom Rauschen zu unterscheiden und kann ohne Aufkonzentrieren der Aliquote nicht mehr nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte auch die Stabilität von **109** im Reaktionspuffer nicht mehr mit Hilfe der UPLC-MS untersucht werden (Abbildung 45 F). Dies gelang bei der gegebenen Peptidkonzentration nur mit der Fluorometrie (Abbildung 45 B). Auch hier wurde wieder die maximale Fluoreszenzintensität durch die Hydrolyse von Thioester **109** mit NH_4OH bestimmt. So konnte die Ausbeute von **110** aus der Reaktion zwischen **109** und **107** ohne Templat **87** mit 2% bestimmt werden (Abbildung 45 B). Die Reaktionsgeschwindigkeit stieg deutlich an nachdem 0.5 Äquivalente Templat **87** hinzugefügt wurden. So stieg die Ausbeute nach 180 min auf 46% (entspricht 92% der Maximalausbeute) an. Die Hydrolyse des Thioesters allein im Reaktionspuffer erfolgte mit einer Ausbeute von 1.9%. Das bedeutet, dass die Reaktivität von Peptidthioestern wie **109** hoch genug war, um eine fNCL durchzuführen. Zudem lieferten die Echtzeit-Fluorometrie und UPLC-MS als orthogonale Messmethoden ähnliche Ergebnisse. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass im Folgenden auf zeitaufwendige UPLC-Analysen verzichtet werden konnte.

4.4 Doppelsträngige DNA Template für die fNCL

Die Transkription jedes Gens wird durch regulatorische Regionen der DNA gesteuert.^{267,268} Diese Regionen bestehen aus kurzen Abschnitten von DNA mit definierten Sequenzen, welche von genregulierenden Proteinen gebunden werden können. Es existiert eine Vielzahl von Strategien, wie Proteine DNA binden und erkennen können.^{269,270}

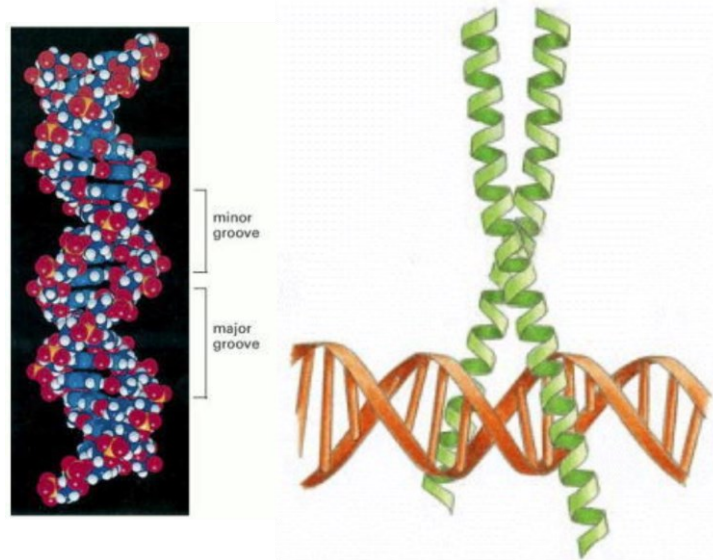


Abbildung 46: Proteine können doppelsträngige DNA binden. Hier: zwei Coiled-coil-Peptide bilden ein Dimer und binden die doppelsträngige DNA an der großen Furche.

Ein häufig untersuchtes DNA-Bindungsmotiv ist der Leucin-Reißverschluss (*basic leucine zipper*, bZIP).²⁷¹ Das bZIP-Motiv vermittelt sowohl die Bindung an der DNA als auch die Proteindimerisierung. Hier werden zwei α -Helices in Gegenwart von DNA so zusammengeführt, dass ein Coiled-coil-Dimer entsteht. Diese zwei α -Helices trennen sich an ihren Enden so auf, dass sie eine Y-förmige Struktur bilden (Abbildung 46). Diese binden die DNA wie eine Wäscheklammer (Abbildung 46). Viele genregulierende bZIP-Proteine binden DNA als Homodimere. Regulatorische Proteine, wie bZIP, können sich aber auch aus nicht identischen Monomeren zusammenfügen, um Heterodimere zu bilden. Dieses Verhalten erweitert das Repertoire an Spezifität wie DNA gebunden werden kann. Werden z.B. zwei unterschiedliche bZIP-Monomere vermischt, werden bereits drei verschiedene DNA-Bindungsspezifitäten erhalten. Bei drei unterschiedliche Monomere, sind es schon sechs und so weiter.

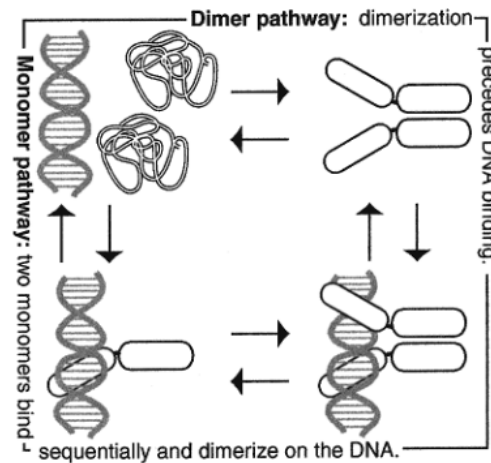


Abbildung 47: Möglichkeiten der Dimerisierung von Proteinen an doppelsträngiger DNA. Die Dimerisierung kann über eine sogenannte „monomere Route“ stattfinden. Hier binden die DNA-bindenden Proteine nacheinander an der doppelsträngigen DNA (untere Route). Die Dimerisierung von DNA-bindenden Proteinen kann aber auch vor der Bindung der DNA stattfinden („dimere Route“; obere Route).

Einige der einfachsten DNA-Erkennungsmotive (Abbildung 48) lassen sich in den dimeren Transkriptionsfaktoren der bZIP, Homeodomäne, Rel/NF- κ B und HLH-Familien finden. Kinetisch gibt es zwei Extremwerte bei der Dimerisierung zweier Proteine in der Anwesenheit einer doppelsträngigen DNA. Einmal die „dimere Route“ und zum andern die „monomere Route“ (Abbildung 47). Oft wird die sogenannte „monomere Route“ der sogenannten „dimeren Route“ bevorzugt.^{272,273} Einmal werden beide Bindungsschritte der monomeren Route durch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und DNA unterstützt. Die elektrostatischen Kräfte wirken über große Distanzen und beschleunigen die Assoziationsgeschwindigkeit. Somit ist die monomere Route in vielen Fällen die schnellere Route. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der finalen Komplexbildung in der dimeren Route ist dagegen die langsamer ablaufende Proteindimerisierung. Weiterhin ist das Monomer-DNA-Intermediat kinetisch weniger stabil als der Dimer-DNA-Komplex. Das Fluorescein(FAM)-Rhodamin(Rho)-FRET-Systems wurde als Werkzeug für die Untersuchung von Jun-Fos-Dimer-Bildungs-Kinetiken an doppelsträngiger DNA verwendet.²⁷³ Als doppelsträngige DNA wurde die AP-1 Erkennungssequenz mit dem palindromischen DNA-Motiv 5'-TGA G/C TCA-3' verwendet.

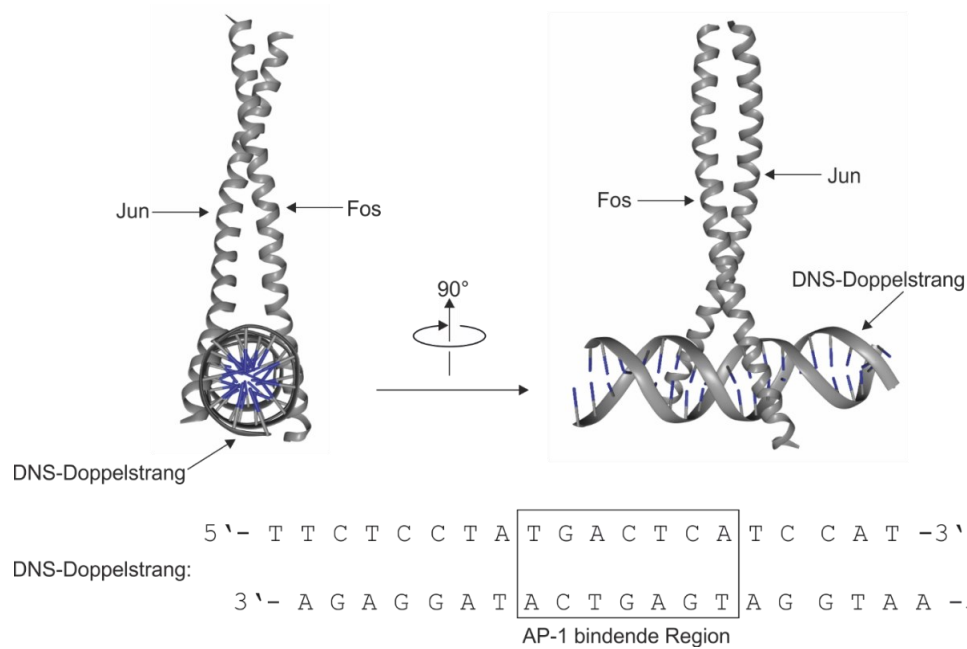


Abbildung 48: Schematische Darstellung des DNA-Doppelstrangs mit der AP-1 bindenden Region und den Jun- und Fos-Proteinen, welche diese als Heterodimer binden können.

Ausgehend hiervon soll nun überprüft werden, inwiefern die Zugabe der AP-1-DNA-Sequenz dazu genutzt werden kann, die Annäherung der Leucin-Zipper-Motive von Jun und Fos zu beschleunigen kann. Die AP-1-DNA soll als Templat dieser Reaktion fungieren. Der Verlauf der Reaktion sollte wieder mit Hilfe der neuen fluorogenen nativen Peptidverknüpfung überwacht werden. Hierzu mussten die Jun- und Fos-Peptide als Thioester und Cysteinylopeptide modifiziert werden. Diese reaktiven Gruppen sollen am C-Terminus platziert werden, da sich Jun und Fos bei der Bildung des Jun-Fos-Heterodimers an der dsDNA annähern.

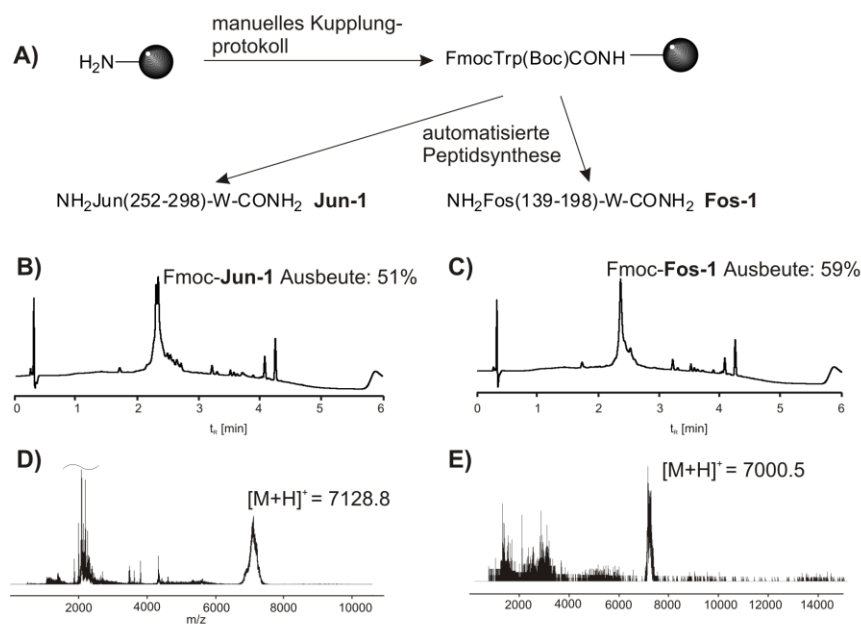


Abbildung 49: A) Testsynthese zur Bestimmung der Machbarkeit der linearen Synthese der Jun- und Fos-Proteine **Jun-1** und **Fos-1**. Zur Bestimmung der Ausbeuten wurde das Harz initial mit Tryptophan vorbeladen. B) Chromatogramm der unaufgereinigten Abspaltungslösung von **Jun-1**. Die Ausbeute wurde mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie mit der Fmoc-Abspaltungslösung bei 301 nm bestimmt. C) Chromatogramm der unaufgereinigten Abspaltungslösung von **Fos-1**. Die Ausbeute wurde identisch zu C) bestimmt. D) MALDI-TOF-Spektrum der unaufgereinigten Abspaltungslösung von Fmoc geschützten Jun-1. Gefundene Masse für Fmoc geschützten **Jun-1**: 7128.8 [M+H]⁺. Gesuchte Masse für Fmoc geschützten **Jun-1**: 7128.4 [M+H]⁺. E) MALDI-TOF-Spektrum der unaufgereinigten Abspaltungslösung von Fmoc geschützten **Fos-1**. Gefundene Masse für Fmoc geschützten **Fos-1**: 7000.5 [M+H]⁺. Gesuchte Masse für Fmoc geschützten **Fos-1**: 7003.9 [M+H]⁺.

Da es sich bei Jun- und Fos-Proteine um relativ große Peptide handelt, sollte zunächst die Machbarkeit der Synthese überprüft werden. Zur Synthese wurden aus Jun der Abschnitt von Aminosäure 242-298 (**Jun-1** Abbildung 49 A) verwendet. Von Fos wird der Abschnitt von Aminosäure 139-193 (**Fos1** Abbildung 49 A) verwendet. Das Fos-Peptid ist ein 54-mer, wobei Jun-Peptid ein 57mer ist. Beide Peptide besitzen einen Coiled-coil C-Terminus und einen basischen N-Terminus. Die Coiled-coil-Motive bestehen bei beiden Peptiden aus 28 Aminosäuren, was 4 Heptadwiederholungen entspricht. So ist sichergestellt, dass die Leucin-Zipper-Domänen von Jun und Fos sich gegenseitig erkennen können. Die basischen Eigenschaften des N-Terminus sind durch die vermehrte Anwesenheit von Lysin und Arginin gegeben. Zur Überwachung der Ausbeuten mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie, wurde am C-Terminus bei Fos und Jun jeweils ein Tryptophan eingefügt. Das Tryptophan wurde manuell auf das Harz gekuppelt, um anschließend die entsprechende Peptidsequenz durch den Peptidsynthesizer auf dem Harz aufzubauen (Abbildung 49 A). Ab der 8. Aminosäure wurde eine Doppelkupplung durchgeführt. Für das Jun-Peptid **Jun-1** konnten Ausbeuten von 51% nach Fmoc-Abspaltung (Abbildung 49 B) und für das Fos-Peptid

Fos-1 59% nach Fmoc-Abspaltung (Abbildung 49 C) erreicht werden. Auch die MALDI-Messungen aus den unaufgereinigten Abspaltlösungen beider Peptide zeigten die entsprechenden Zielmassen der beiden Peptide im MALDI-Spektrogramm (Abbildung 49 D, E). Beim Jun-Peptid zeigte sich eine Abbruchsequenz bei 282Ser und viele Abbruchsequenzen im basischen Abschnitt des Peptids (Abbildung 49 D, E). Dennoch waren die Ausbeuten und Reinheiten ausreichend, um dieses Syntheseprotokoll für die kommenden Peptidsynthesen anzuwenden.

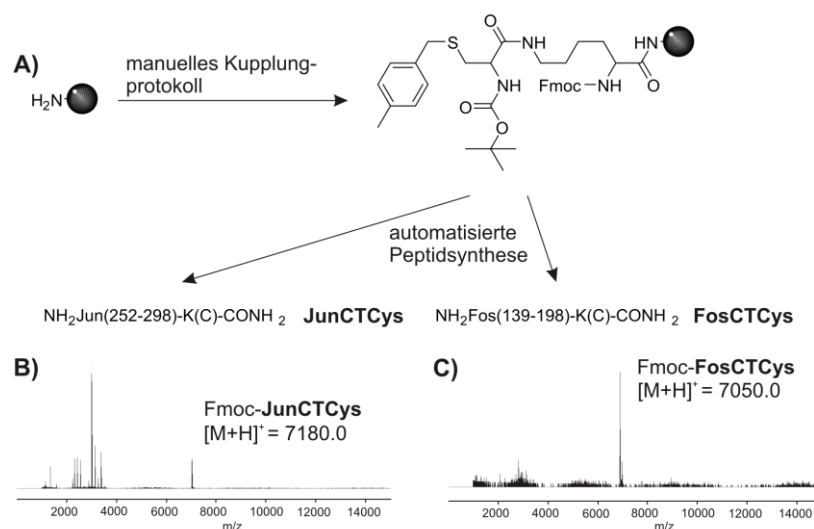


Abbildung 50: A) Synthese der von den Jun- und Fos-Protein abgeleiteten C-terminalen Cysteinylpeptiden **JunCTCys** und **FosCTCys**. B) MALDI-TOF-Spektrogramm der unaufgereinigten Abspaltlösung von Fmoc geschützten **JunCTCys**. Gefundene Masse für Fmoc geschützten **JunCTCys**: $7180.0 [M+H]^+$. Gesuchte Masse für Fmoc geschützten **JunCTCys**: $7173.6 [M+H]^+$. C) MALDI-TOF-Spektrogramm der unaufgereinigten Abspaltlösung von Fmoc geschützten **FosCTCys**. Gefundene Masse für Fmoc geschützten **FosCTCys**: $7050.0 [M+H]^+$. Gesuchte Masse für Fmoc geschützten **FosCTCys**: $7049.0 [M+H]^+$.

Um die fNCL zwischen den Jun- und Fos-Peptiden mit Hilfe von DNA als Templat durchführen zu können, sollen die C-Termini entsprechend als fluorogener Thioester und als Cysteinylpeptid modifiziert werden. Die Modifizierung mit Cystein stellte sich dabei als unproblematisch heraus. Cystein wurde an den C-Terminus beider Peptide gebracht, indem ein ChemMatrix Harz mit Fmoc-Lys(Mmt)-OH beladen wurde. Anschließend wurde mit verdünnter TFA-Lösung das Mmt entfernt. Das freie ϵ -Amin konnte so wiederum mit Boc-Cys(MeBzl)-OH modifiziert werden (Abbildung 50 A). Anschließend konnte das Jun- und Fos-Peptid wie oben beschrieben mit Hilfe der automatisierten Peptidsynthese aufgebaut werden. Der Aufbau dieser Cysteinylpeptide verlief analog zu den unmodifizierten Peptiden. Die C-terminalen Cystein-funktionalisierten Jun- und Fos-Peptide werden im Folgenden als **JunCTCys** bzw. als

FosCTCys bezeichnet. **JunCTCys** wurde mit einer Ausbeute von 37% (Abbildung 50 B) und **FosCTCys** von 56% (Abbildung 50 C) erhalten werden.

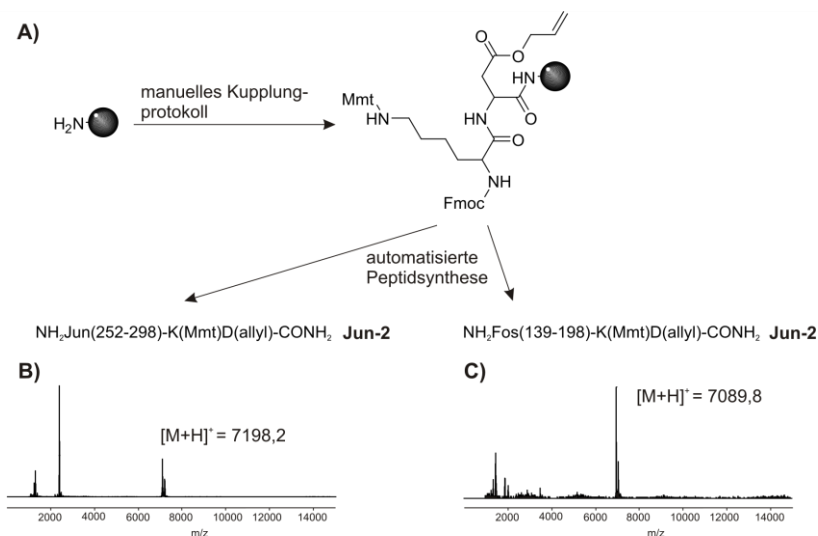




Abbildung 51: A) Synthese der von den Jun- und Fos-Protein abgeleiteten C-terminal modifizierten Peptiden **Jun-2** und **Fos-2**. B) MALDI-TOF-Spektum der unaufgereinigten Abspaltlösung von **Jun-2**. Gefundene Masse für **Jun-2**: 7198,2 $[M+H]^+$. Gesuchte Masse für **Jun-2**: 7225,4 $[M+H]^+$. C) MALDI-TOF-Spektum der unaufgereinigten Abspaltlösung von **Fos-2**. Gefundene Masse für **Fos-2**: 7089,8 $[M+H]^+$. Gesuchte Masse für **Fos-2**: 7101,1 $[M+H]^+$.

Um die charakteristische fluorogene Thioesterstruktur aufzubauen, wurde ein ChemMatrix Harz mit Allyl-geschützten Asparaginsäure (Fmoc-Asp(OAllyl)-OH) beladen, um nach anschließender Fmoc-Deblockierung weiter mit Mmt-geschützten Lysin (Fmoc-Lys(Mmt)-OH) modifiziert zu werden (Abbildung 51 A). An dieser Stelle wurde nicht die in Abschnitt 4.3.1 gefundenen Bedingungen verwendet, da diese zu der Zeit noch nicht optimiert waren. Die entsprechend modifizierten Harze wurden um die Jun- und Fos-Sequenzen verlängert, um eine Identifizierung mit Hilfe von MALDI durchzuführen. Die Ausbeuten für die so verlängerten Jun- und Fos-Peptide **Jun-2** und **Fos-2** betrugen jeweils 53% (Abbildung 51 B) und 52% (Abbildung 51 C) und entsprechen so denen aus den oben gezeigten Synthesen.

A)

H_2N  $\xrightarrow{\text{manuelles Kupplungsprotokoll}}$ . The structure shows a resin bead attached to a peptide chain with a tert-butyl ester, a black bead, and an Fmoc-protected amine." data-bbox="415 45 615 285"/>

B)

automatisierte Peptidsynthese

$\text{NH}_2\text{-G-Jun(252-298)-KE(allyl)-CONH}_2$ **Jun-3**

a)

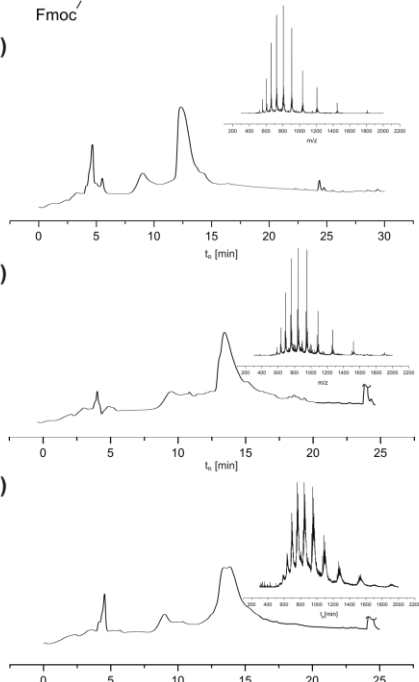
$\text{NH}_2\text{-G-Jun(252-298)-K(FAM)E(allyl)-CONH}_2$ **Jun-4**

b)

$\text{NH}_2\text{-G-Jun(252-298)-K(FAM)E(COSQ)-CONH}_2$ **Jun-5**

C)

D)



Es stellte sich früh heraus, dass die Veresterung der Asparaginseitenkette mit dem Fluoreszenzlöcher unter der Anwesenheit von PyBoP lediglich zur quantitativen Aspartimidbildung führte. Somit wurde Asparaginsäure durch Glutaminsäure ersetzt (Abbildung 52 B).

63

Ausbeuten. Um Überacetylierungen zu verhindern, wurde an dieser Stelle bei der folgenden Modifikation des Mmt-geschützten Lysins mit FAM zusätzlich ein Pivalonsäure geschütztes FAM-Molekül verwendet.

Da die Fmoc-Gruppe schon vor der Thioester-Bildung entfernt wurde, wurde die Jun- und Fos-Sequenzen am N-Terminus zusätzlich um eine Boc-Gly-OH-Gruppe verlängert, um den freien N-Terminus beider Peptide zu blockieren. Würde die Fmoc-Entschützung nach der Thioester-Bildung durchgeführt werden, würde ein vorhandener Thioester der Aminolyse durch Piperidin unterliegen. Schließlich kann durch die finale Abspaltung des Peptids sichergestellt werden, dass alle am Ende der Synthese vorhandenen Schutzgruppen durch TFA entfernt werden, um schließlich das vollständig entschützte Volllängenpeptid zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kupplung von FAM(OPiv)₂ unter diesen Umständen (1.5 Äq FAM(OPiv)₂, 3 Äq PyBOP, 3 Äq Oxyma, 6 Äq DIPEA) möglich ist. Durch die vollständige Abspaltung der Zielsequenz mit TFA konnte das gewünschte Reaktionsprodukt **Jun-4** in der Rohmischung nachgewiesen werden (Abbildung 52 C). Zudem konnten noch Spuren von partiell nicht vollständig Pivalonsäure-deblockierter FAM-Molekülen nachgewiesen werden. An dieser Stelle war eine schlechte Auftrennung des Hauptprodukts von den Nebenprodukten in der HPLC zu beobachten. Das Problem des unvollständig deblockierten FAM-Bausteins, könnte einfach durch den Zusatz von TFMSA zum Abspaltcocktail gelöst werden. Anschließend wurde die allyl-geschützte Carboxylseitenkette der C-terminalen Glutaminsäure mit Hilfe von Pd(Ph₃)₄ deblockiert. Danach wurden 5 Äq **HSQ**, 5 Äq PyBOP, 5 Äq Oxyma und 10 Äq DIPEA auf das Harz gegeben. Das Chromatogramm der Abspaltemischung zeigte im Vergleich zu dem von **Jun-4** wenig Unterschiede (Abbildung 52 D). Eine ausreichende HPLC-Auftrennung konnte nicht beobachtet werden. Weiterhin konnte mittels ESI-MS das gewünschte Reaktionsprodukt **Jun-5** in der Vielzahl der Signale nicht nachgewiesen werden. Somit fand kein erfolgreicher Umsatz von der Carbonsäureseitenkette der C-terminalen Glutaminsäure mit dem Fluoreszenzlöschers statt. Wurde die Veresterung mit **HSQ** vor der FAM-Markierung durchgeführt, konnten die gewünschten Thioester **Jun-5** und **Fos-5** in den Rohmischungen nachgewiesen werden. Auch hier konnten die Peptide aufgrund der schlechten Auftrennung im Chromatogramm nicht isoliert werden. Die Ausbeuten von **Jun-5** und **Fos-5** konnten lediglich mit dem Dekonvolierungs-Werkzeug im Massenspektrometer auf 15% bzw. 10% abgeschätzt werden. Die Anwesenheit von FAM am benachbarten Lysin beeinflusste die Veresterung sterisch

derart, dass diese nicht stattfinden konnte. So musste in Frage gestellt werden, dass mit dieser Strategie ein Zugang zur charakteristischen fluorogenen Thioesterstruktur an den C-Termini von den Jun- und Fos-Peptiden möglich war.

Dabei wurden zwei Hauptprobleme identifiziert. Zum einen, die geringe Auftrennung und somit die daraus folgenden Probleme bei der Isolierung der Zielmoleküle. Zum anderen werden nach dem Aufbau der mit Boc-Gly-OH modifizierten Jun- und Fos-Peptide zu viele Reaktionsschritte benötigt, um zum Zielmolekül zu gelangen. So wären es von der Mmt-Deblockierung bis zum Aufbau der charakteristischen fluorogenen Thioesterstruktur bereits vier Reaktionsschritte: die Mmt-Entschützung, die Kupplung von FAM, die Allyl-Entschützung und die Veresterung mit **HSQ**. Nicht jeder dieser Reaktionsschritte kann quantitativ ablaufen. Es muss eine Möglichkeit gesucht werden die charakteristische fluorogene Thioesterstruktur in möglichst wenigen Reaktionsschritten mit schnellen Reaktionszeiten aufzubauen. Die Kupfer-katalysierte Cycloaddition zwischen einem organischen Azid und einem Alkin (CuAAC) ist eine schnelle Reaktion und kann in DMF der fester Phase durchgeführt werden. Sie ist kompatibel mit den permanenten Schutzgruppen am Volllängenpeptid. Es wurde ein auf Azidolysin basierendes Monomer synthetisiert, welches bereits die fluorogenen Eigenschaften trägt. Dies Monomer soll die FRET-Partner Fluorescein und Dispers Rot tragen. Durch FRET wird die Fluorescein-Fluoreszenz von Dispers-Rot-Rest gelöscht.

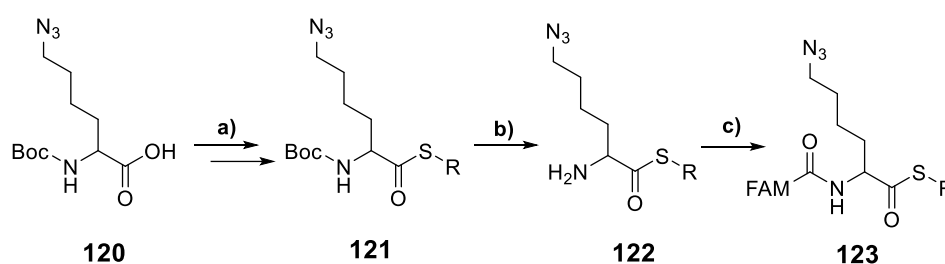


Abbildung 53: **a)** **HSQ**, DIPEA, PyBOP 16 h in DMF, 80 %, **b)** 4 M HCl in Doxan, 30 min, quant., **c)** 5/6-Carboxyfluorescein (FAM), PyBOP in DMF, 16 h, 70 %.

Molekül **123** sollte die Einführung der fluorogenen Thioesterstruktur in die Jun- und Fos Peptide ermöglichen (Abbildung 53). Die Carboxylfunktion von **120** wurde dabei in einen Thioester umgewandelt, wobei es sich bei dem Thiol um **HSQ** handelt. Der α -Stickstoff wurde über eine Amidbindung mit ein 5/6-Carboxyfluorescein ausgestattet. Der ϵ -Stickstoff lag als Azid vor.

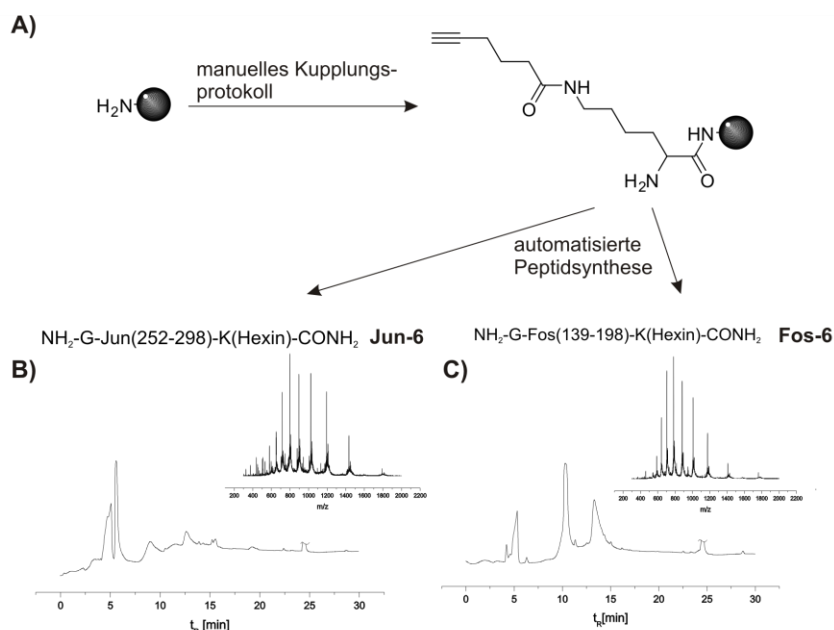


Abbildung 54: A) Synthese der von **Jun-6** und **Fos-6** als C-terminal modifizierte Peptide, welche sich von den Jun- und Fos-Proteinen ableiten. B) Chromatogramm der unaufgereinigten Abspaltung von **Jun-6**. C) Chromatogramm der unaufgereinigten Abspaltung von **Jun-6**.

Das für die CuAAC benötigte Alkin wurde in Form von Hexin am C-Terminus der Jun- und Fos-Peptiden platziert (Abbildung 54 A). Hierzu wurde ein ChemMatrix Harz mit Fmoc-Lys(Mmt)OH beladen und anschließend wurde die Mmt-Schutzgruppe mit 2% TFA entfernt. Das freie ε-Amin konnte durch eine Amidbindung mit 5-Hexinsäure verknüpft werden, um **Fos-6** und **Jun-6** zu erhalten, wurde vorher mit Hexin beladene Harz unter den anfangs optimierten Reaktionsbedingungen mit Hilfe der automatisierten Festphasensynthese um die Jun- und Fos-Sequenzen erweitert (Abbildung 54). Um zu verhindern, dass während der Click-Reaktion freie N-terminale Amine anwesend sind, welche den Thioester in **123** hydrolysieren könnten, wurden die Vollängenpeptide von Fmoc befreit und um ein Boc-Gly-OH verlängert. Denn die Boc-Schutzgruppe wird während der Abspaltung des Vollängenpeptids entfernt. Die Entschützung des N-terminalen Amins von Fmoc ist in Anwesenheit des gebildeten Thioesters nicht mehr möglich ohne den Thioester zu zerstören. Die alkinmodifizierten, harzgebundenen Jun- und Fos-Peptide wurden mit dem fluorogenen Azidomonomer im Überschuss zur Reaktion gebracht. Dazu wurden 4 Äq fluorogenes Azidomonomer **123** in der Anwesenheit von 20 Äq DIPEA in einer gesättigten CuI-DMF-Lösung auf das Harz gegeben. Das überschüssige fluorogene Azidomonomer konnte einfach vom Harz filtriert und gewaschen werden. Die Rohmischung der so modifizierten Jun- und Fos-Peptide zeigten beide einen neuen Peak bei höheren Retentionszeiten im HPLC-Chromatogramm (vgl. Abbildung 55 A mit Abbildung 55 C und Abbildung 55 B mit

Abbildung 55 D). Diese Peaks konnten durch die ESI-Spektren als die gewünschten Cycloadditionsprodukte von Jun-6 und Fos-6 mit dem fluorogenen Azidomonomer **123** identifiziert werden. Für die Jun- und Fos-Peptide wurden Umsätze von 36% bzw. 48% ermittelt. Diese Methode zeigte eine deutlich verbesserte Auftrennung der Reaktionsprodukte und die gewünschten C-terminalen fluorogenen Thioester konnten isoliert werden. Die entsprechenden Jun- und Fos-Thioester werden im Folgenden als **JunCTTE** (**Jun C-Terminaler ThioEster**) und als **FosCTTE** (**Fos C-Terminaler ThioEster**) bezeichnet (Abbildung 55 E, Abbildung 55 F).

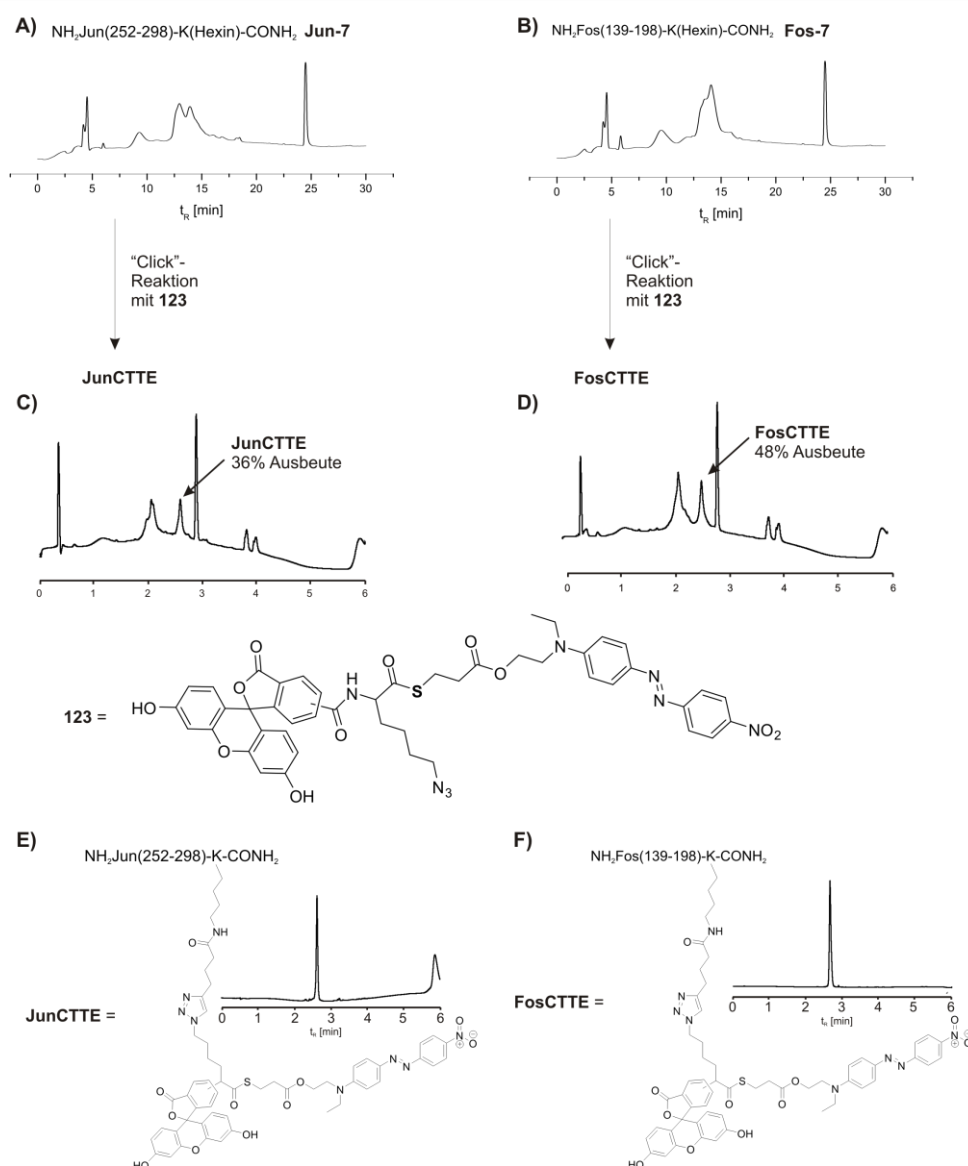


Abbildung 55: A) Chromatogramm von **Jun-7** zur Durchführung einer Click-Reaktion am Harz. B) Chromatogramm von **Fos-7** zur Durchführung einer Click-Reaktion am Harz. C) Chromatogramm der unaufgereinigten Abspaltung von **JunCTTE**. D) Chromatogramm der unaufgereinigten Abspaltung von **FosCTTE**. E) Struktur von **JunCTTE**. Chromatogramm des HPLC-aufgereinigten **JunCTTE**. F) Struktur von **FosCTTE**. Chromatogramm des HPLC-aufgereinigten **FosCTTE**. Die auf das Harz gegebene Reaktionslösung für die „Click“-Reaktion enthielt **123**, DIPEA, CuI in DMF.

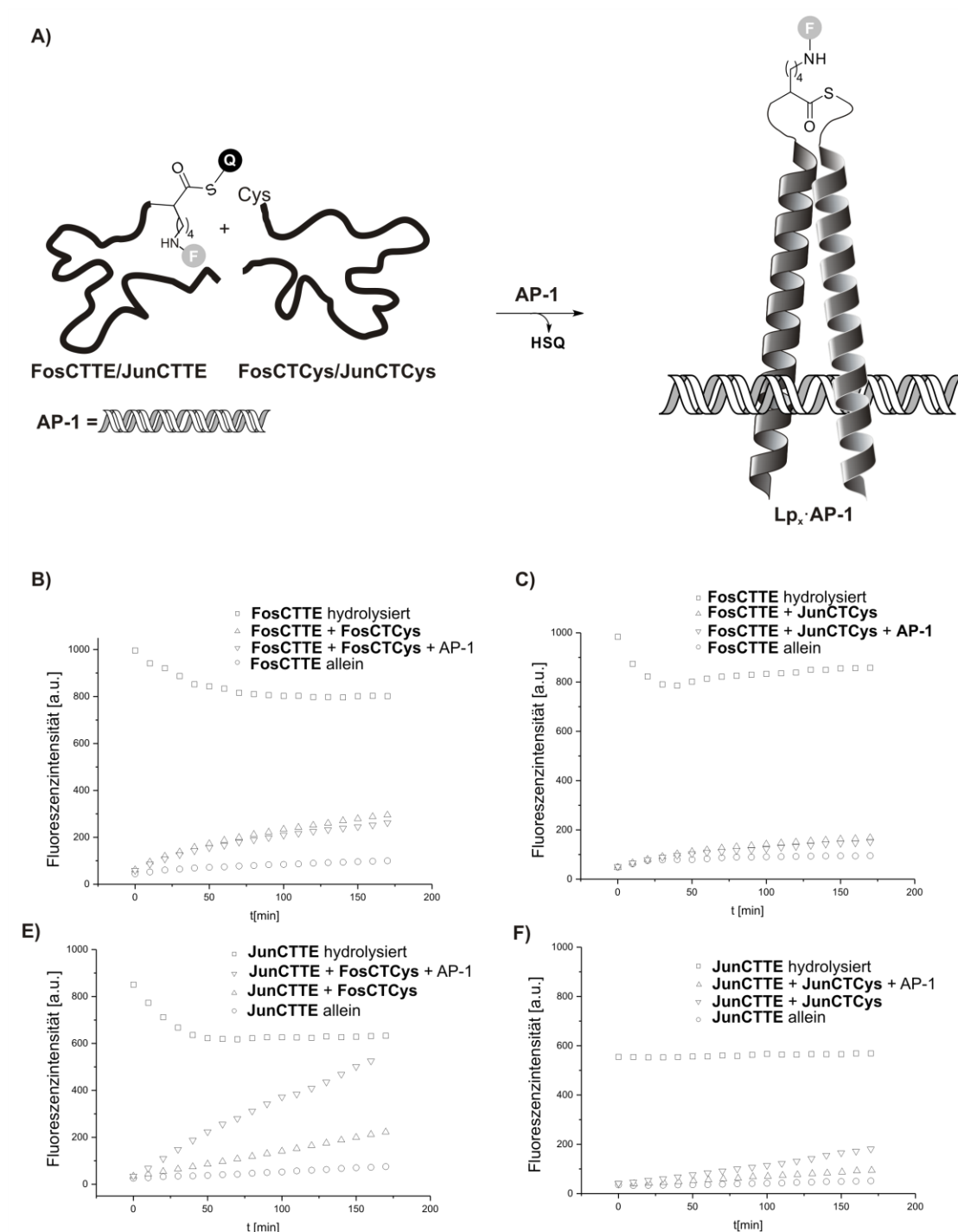


Abbildung 56: Die Fluoreszenzintensität wurde bei 525 nm bestimmt. **A)** Reaktionsschema für die Templat-gesteuerte fNCL der Thioester **JunCTTE** und **FosCTTE** und den Cysteinylopeptiden **FosCTCys** und **JunCTCys** in Anwesenheit der dsDNA **AP-1**. **B)-F)** Fluoreszenzintensitäten der Reaktion von **FosCTTE** und **JunCTTE** mit **FosCTCys** und **JunCTCys** in An- und Abwesenheit von **AP-1** bei einer Peptidkonzentration von 0.5 μM .

Um die Hydrolyseempfindlichkeit (Hintergrundreaktion) von **JunCTTE** und **FosCTTE** bei einer Konzentration von 0.5 μM Peptid im Reaktionspuffer(+/- AP1-dsDNA, 100 mM NaH_2PO_4 , 100 μM TCEP, 1% „Roche Blocking Agent“, pH 7,0) zu untersuchen, wurden **JunCTTE** und **FosCTTE** im Fluoreszenzspektrometer über 180 Minuten beobachtet. Sowohl **JunCTTE**, als auch **FosCTTE** zeigen eine sehr konstante

Hintergrundreaktion, wodurch angenommen werden konnte, dass die entsprechenden Thioester unter den gegebenen Reaktionsbedingungen hydrolysestabil ist. Werden die mit NH_4OH hydrolysierten Thioester vermessen, konnte eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Für die fluorogene native chemische Peptidverknüpfung kann dieser Wert als quantitativer Umsatzes (100%-Wert) definiert werden (Abbildung 57 A, B).

Es zeigte sich, dass dieser Wert nicht immer konstant blieb. In drei von vier unabhängigen Experimenten sank dieser über die Messzeit und erreichte anschließend eine Art Plateau (vgl. Abbildung 56 B, C und E). Dabei zeigte sich nach einer Zeit von 180 min noch ein Anteil der Initialfluoreszenzintensität von 79% (**FosCTTE** hydrolysiert, Abbildung 56 A), 78% (**FosCTTE** hydrolysiert, Abbildung 56 B), 72% (**JunCTTE** hydrolysiert, Abbildung 56 C) und 0% (**JunCTTE** hydrolysiert, Abbildung 56 D). Um einen Templat-Effekt bei der Reaktion der fluorogenen Thioester mit einem angenäherten Cysteinylpeptid nachzuweisen, mussten die Reaktionskinetiken der fluorogenen Thioester mit den Cysteinylpeptiden in An- und Abwesenheit des DNA-Templats beobachtet werden. Bei der **JunCTTE** konnte durch das alleinige Hinzufügen von **JunCTCys**, allerdings auch **FosCTCys** ein Anstieg der Fluoreszenzintensität nach 180 min beobachtet werden (Abbildung 57 A, B). Dieser Effekt konnte auf die Anwesenheit der entsprechenden Cysteinylpeptide zurückgeführt werden. Der gleiche Effekt kann bei **FosCTTE** mit **JunCTCys** und **FosCTCys** beobachtet werden (Abbildung 57 A). Wurden äquimolare Mengen der doppelsträngigen AP-1 Sequenz zu den Thioestern und Cysteinylpeptiden hinzugegeben, konnte bei den Reaktionen mit **FosCTTE** kein weiterer Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit, verglichen zur Reaktion von **FosCTTE** mit **JunCTCys** bzw. **FosCTCys**, beobachtet werden. Im Gegensatz dazu kann bei **JunCTTE** durch die Zugabe von AP-1 des Fluoreszenzsignal nach 180 min, sowohl mit **JunCTCys**, als auch mit **FosCTCys** beobachtet werden.

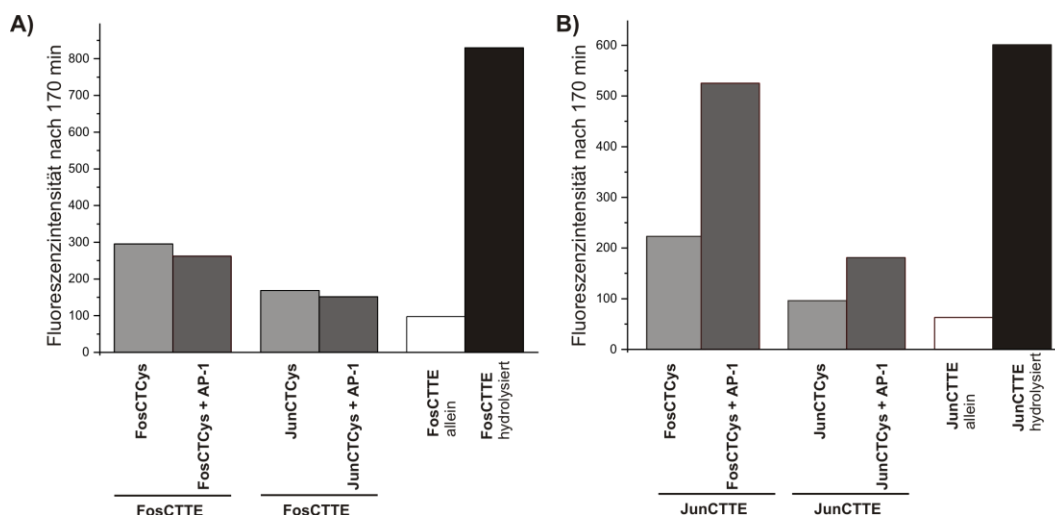


Abbildung 57: Übersicht zu den Ligationsexperimenten zwischen den von den Jun- und Fos-Peptiden abgeleiteten Thioestern und Cysteinylpeptiden in An- und Abwesenheit des DNA-Doppelstranges AP-1. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 525 nm bestimmt. **A)** Native chemische Peptidverknüpfung von **FosCTTE** mit Zugabe von **FosCTCys**, **JunCTCys** und AP-1. **B)** Native chemische Peptidverknüpfung von **JunCTTE** mit Zugabe von **FosCTCys**, **JunCTCys** und AP-1.

Obwohl bei der Reaktion von **FosCTTE** mit **JunCTCys** eine vergleichbare Bindungsmechanik wie bei **JunCTTE** und **FosCTCys** beobachtet wird, trat hier kein stärkerer Anstieg der Fluoreszenzintensität auf. Das Ausbleiben eines Fluoreszenzanstiegs bei der Reaktion von **FosCTTE** und **FosCTCys** mit AP-1 könnte durch den zu hohen K_D -Wert des Fos-Homodimers ($K_D \approx 6 \mu\text{M}$)²⁷⁴ erklärt werden. Das Ausbleiben eines Fluoreszenzanstiegs bei **FosCTTE** und **JunCTCys** mit AP-1 kann jedoch nicht erklärt werden. Die Tendenz vom Jun-Homodimer zur Bindung der AP-1 Sequenz konnte auch nicht beobachtet werden (Abbildung 56 D).²⁷⁵

Es sollte die Ursache für die immer wieder auftretende Absenkung der Fluoreszenzintensität der hydrolysierten Thioestern im Reaktionspuffer gefunden werden. Der Verlust an Fluoreszenzintensität kann etwa auf die Bildung von Jun- oder Fos-Homodimeren zurückzuführen sein. Das würde die lokale Konzentration an FAM-Molekülen in den Homodimeren am C-Terminus erhöhen und könnte zu einer Unterdrückung der FAM-Fluoreszenz durch ein benachbartes FAM-Molekül führen. Gerade beim Durchführen der Reaktionen im wässrigen Medium tendieren die hydrophoben Leucin-Zipper-Domänen dazu, sich selbst zu binden. Über die Reaktionszeit würden sich so immer mehr FAM-markierte Homodimere bilden. Dies kann zu einer ungewollten Auslöschung der zu beobachteten Fluoreszenz führen. Auch wurde im Verlauf der Experimente eine verminderte Löslichkeit der CuAAC-modifizierten Peptide festgestellt. Um das Löslichkeitsproblem weiter zu untersuchen, sollen nun der hydrolysierte Jun-Thioester in Anwesenheit von amphiphilen

Detergentien im Reaktionspuffer vermessen werden. Um zu untersuchen, ob das Absinken der Maximalfluoreszenz durch die Bildung der oben beschriebenen Homodimeren zurückzuführen war, sollen zudem strukturbrechende Detergentien zum Einsatz kommen.

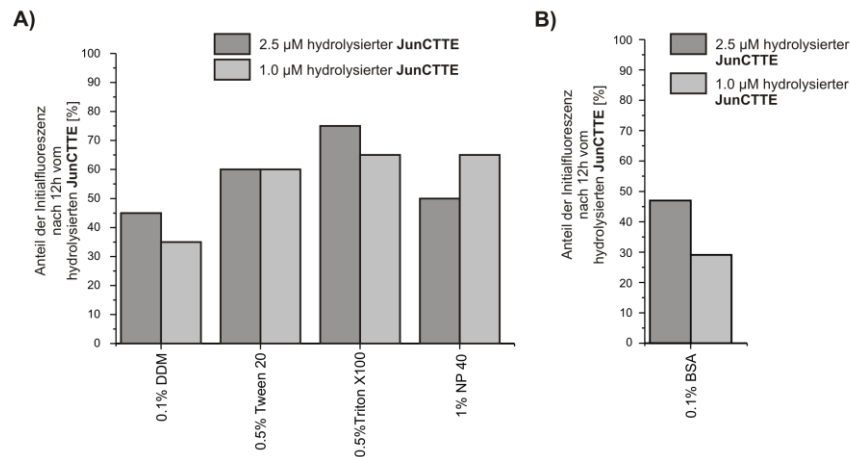


Abbildung 58: Die Fluoreszenzintensität wurde bei 525 nm bestimmt. **A)** Anteile der Initialfluoreszenzen des hydrolysierten Thioesters **JunCTTE** nach 12 h unter der Zugabe von 0.1% DDM, 0.5% Tween 20, 0.5 % Triton X100, 1% NP 40 und **B)** 0.1% BSA zum Puffer. Puffer: 100mM NaH₂PO₄, 1mM TCEP, pH 7.0.

Als amphiphile Detergentien wurden n-Dodecyl β -D-maltoside (DDM), Tween 20, Triton X100 und NP40 verwendet. Diese Detergentien sind in der Lage Mizellen zu bilden, sollten aber die strukturelle Integrität der Peptide erhalten und agieren so als Löslichkeitsvermittler. Die hydrolysierten Peptide wurden bei 2.5 μ M und 1 μ M in Anwesenheit der vier genannten Detergentien beobachtet. Dabei ließ sich für beide Konzentrationen bei allen Detergentien ein starker Abfall der Fluoreszenzintensität über die Reaktionszeit (Endpunkt = 12 h) beobachten. Sowohl bei 2.5 μ M und 1 μ M sinkt die Fluoreszenzintensität anfangs sehr stark und erreicht dann nach 12 h einen konstanten Wert (Abbildung 58 A). Bei 2.5 μ M sank die Fluoreszenzintensität auf einen Wert von 45% (bei DDM) bis zu 70% (mit Triton X100) der Anfangsfluoreszenz ($t = 0$). Bei 1 μ M sinkt die Fluoreszenzintensität im Bereich von 35% bei DDM bis zu 65% der Anfangsfluoreszenz, sowohl bei NP40 und Triton X100. BSA ist ein häufig verwendetes Detergenz zur Unterdrückung von unspezifischen Bindungen. Durch die Zugabe von BSA sollte untersucht werden, ob die sinkende Fluoreszenzintensität auf unspezifische Bindungen wie z.B. mit dem Küvettenmaterial zurückzuführen ist (Abbildung 58). So führte die Zugabe von BSA zu einem Absinken der Anfangsfluoreszenzintensität auf 45% bei 2.5 μ M Peptidkonzentration des

hydrolysierten Thioesters bis zu 30% bei 1 μM (Abbildung 58 B). Das durch die Erhöhung der Peptidkonzentration geringere Anteile der Initialfluoreszenz des hydrolysierten **JunCTTE** nachgewiesen wurden, deutet darauf hin, dass das Absinken der Fluoreszenzintensität eher auf einen Struktureffekt des hydrolysierten Thioesters und nicht auf Löslichkeitsprobleme oder durch Anhaftung an der Küvettenwand zurückzuführen war. Bei höheren Peptidkonzentrationen wird die Bildung von Homodimeren (Jun-Homodimer: $K_D \approx 4.7 \mu\text{M}$)²⁷³ begünstigt, wodurch die erhöhte Fluoreszenzlöschung erklärt werden könnte. Die Bildung von Mizellen konnte allerdings die vermutete Bindung der Leucin-Zipper-Domänen untereinander nicht verhindern. Es wurden ähnliche Trends für das Absinken der Fluoreszenzintensität wie im wässrigen Puffer beobachtet.

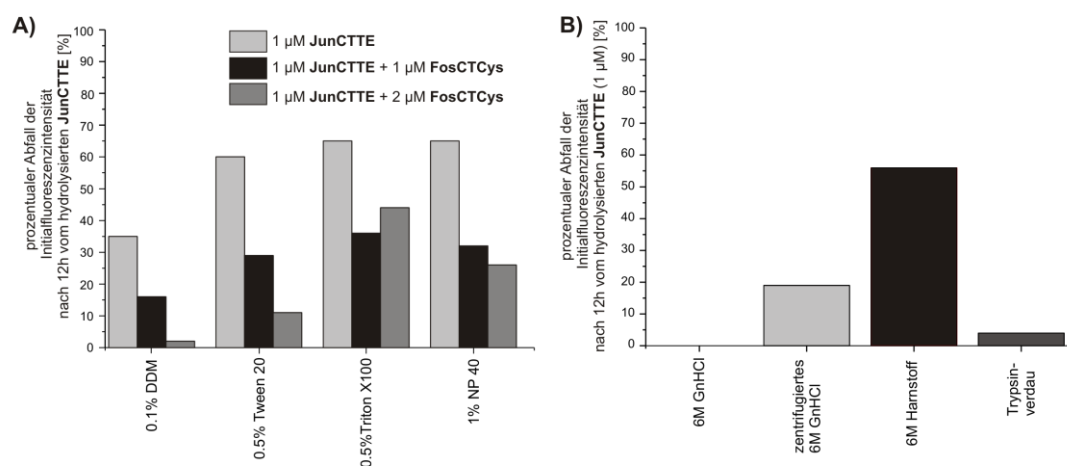


Abbildung 59: Die Fluoreszenzintensität wurde bei 525 nm bestimmt. **A)** Anteile der Initialfluoreszenzen des hydrolysierten Thioesters **JunCTTE** nach 12 h unter der Zugabe von 0.1% DDM, 0.5% Tween 20, 0.5% Triton X100, 1% NP 40 und **FosCTCys** (nach 3 h) zum Puffer. **B)** Anteile der Initialfluoreszenzen des hydrolysierten Thioesters **JunCTTE** nach 12 h unter der Zugabe von Guanidinium Hydrochlorid und Harnstoff. Zusätzlich ist der Anteil der Fluoreszenzintensität von **JunCTTE** nach einem tryptischen Verdau gezeigt.

Sollte das Absinken der Fluoreszenzintensität durch die Bildung von Homodimeren verursacht werden, müsste die Zugabe eines konkurrierenden Bindungspartners, welcher die Wechselwirkung zwischen den Homodimeren unterbricht, dieses Absinken unterdrücken können. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde bei einer Peptidkonzentration von 1 μM **FosCTCys** zu dem hydrolysierten **JunCTTE** gegeben. Dies sollte die Homodimere aufbrechen und die Bildung der entsprechenden Heterodimere ermöglichen (Fos·Fos-Homodimer $K_D \approx 6 \mu\text{M}$, Jun·Fos-Heterodimer $K_D \approx 106 \text{ nM}$ ²⁷³). Cystein am C-Terminus von **FosCTCys** sollte zudem keine fluoreszenzunterdrückenden Eigenschaften haben. Die initiale Zugabe von **FosCTCys** führte direkt zu einer verminderten Abnahme der Fluoreszenzintensität bei einer

Peptidkonzentration von 1 μM (Abbildung 59 A). Die Initialfluoreszenz würde so durch die Zugabe von **FosCTCys** teilweise wieder hergestellt. Auch die Zugabe von **FosCTCys** zu 2 μM hydrolysierten Thioester zeigt in allen Pufferbedingungen einen Anstieg der Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt der Zugabe. So konnte die Zugabe von 2 μM **FosCTCys** zu 1 μM hydrolysierten **JunCTTE** die initiale Fluoreszenzintensität fast komplett wiederherstellen (prozentualer Abfall nach 12 h ohne 2 μM **FosCTCys**: 35%, mit 2 μM **FosCTCys**: 2%). Abbildung 59 zeigt den prozentualen Abfall der Anfangsfluoreszenz ($t = 0$) des hydrolysierten **JunCTTE**. 100% Abfall bedeuten das komplette Verschwinden der Fluoreszenz wohingegen 0% Abfall für den kompletten Erhalt der Anfangsfluoreszenz über die Zeit bedeuten. Die Ergebnisse aus Abbildung 59 sind ein guter Hinweis dafür, dass die Abnahme der Fluoreszenzintensität auf eine Wechselwirkung der beiden Leucin-Zipper-Domänen vom hydrolysierten **JunCTTE** zurückzuführen ist. Um dies auf direktem Wege zu überprüfen, sollte der hydrolysierte Thioester Bedingungen ausgesetzt werden, welche seine strukturelle Integrität unterbrechen. Dazu wurden dem wässrigen Puffer chaotrope Salze hinzugefügt werden. Dabei handelt es sich um Verbindungen, welche hydrophobe Effekte unterbinden und Strukturen, wie Peptide, in Lösung denaturieren können. Es wurde eine Lösung aus 6 M Guanidinium-Hydrochlorid zum hydrolysierten **JunCTTE** gegeben. Es zeigte sich, dass bei der Verwendung von Guanidinium Hydrochlorid kein Abfall (0% Fluoreszenzverlust) in der Fluoreszenzintensität zu beobachten war (Abbildung 59 B). Weiterhin wurde der hydrolysierte Thioester tryptisch verdaut. Trypsin spaltet seine Substrate nach den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Die Fluoreszenzintensität des resultierenden tryptischen Verdaus zeigt einen Abfall von lediglich 4%. Das Absinken der Fluoreszenzintensität anhand dieser Ergebnisse im direkten Zusammenhang mit den strukturellen Eigenschaften vom hydrolysierten **JunCTTE**.

Zusammenfassend musste festgestellt werden, dass die Ergebnisse dieser fNCL keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern. Bei der Verwendung der entsprechenden Jun- und Fos-Peptide in der fNCL finden wohl zu umfangreiche Nebenreaktionen in Konkurrenz zu der gewünschten Verknüpfungsreaktion statt. Es wurde ein Fluoreszenzabfall der hydrolysierten fluorogenen Thioester beobachtet, welcher auf die strukturellen Eigenschaften dieser zurückgeführt wurde. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Einführung des Monomers **123** eine mögliche Reaktion zwischen Thioestern und Cysteinylpeptiden verhindert bzw. behindert. Trotz des geringen K_D -Wert des Jun·Fos-Heterodimers, wird bei der Bindung der beiden Proteine mit dsDNA die „monomere

Route“ durchlaufen.²⁷⁵ Es konnte allerdings kein konsistent wirkender Templat-Effekt von AP-1 auf die Jun- und Fos-Peptide nachgewiesen werden. Im folgenden Abschnitt soll ein anderes Biomolekül als Templat Verwendung finden. Die Wahl fiel hier auf Antikörper.

4.5 Antikörper als Templat für die fNCL

Antikörper oder auch Immunoglobuline sind Y-förmige Proteine, welche sich aus zwei schweren und zwei leichten Ketten zusammensetzen. Die beiden schweren Ketten sind in der sogenannten Hinge-Region über Disulfidgruppen miteinander verknüpft und am Stamm der Y-Form miteinander verbunden. Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen und einer konstanten Domäne. Die leichte Kette bindet die schwere Kette im Bereich der Arme der Y-Form. Dabei bilden die variablen Domänen von schwerer und leichter Kette die Antigenbindungsstelle (Abbildung 60 A). Diese ist dabei in der Lage ein bestimmtes Epitop spezifisch zu binden. Bei Epitopen handelt es sich um Molekülteile oder einzelne Peptidabschnitte eines Proteins. Immunoglobuline der Wirbeltiere sind in verschiedenen Klassen (Isotypen) unterteilt und können als Monomere (IgD, IgE und IgG), Dimere (IgA) und Pentamere (IgM) vorkommen (Abbildung 60 B).

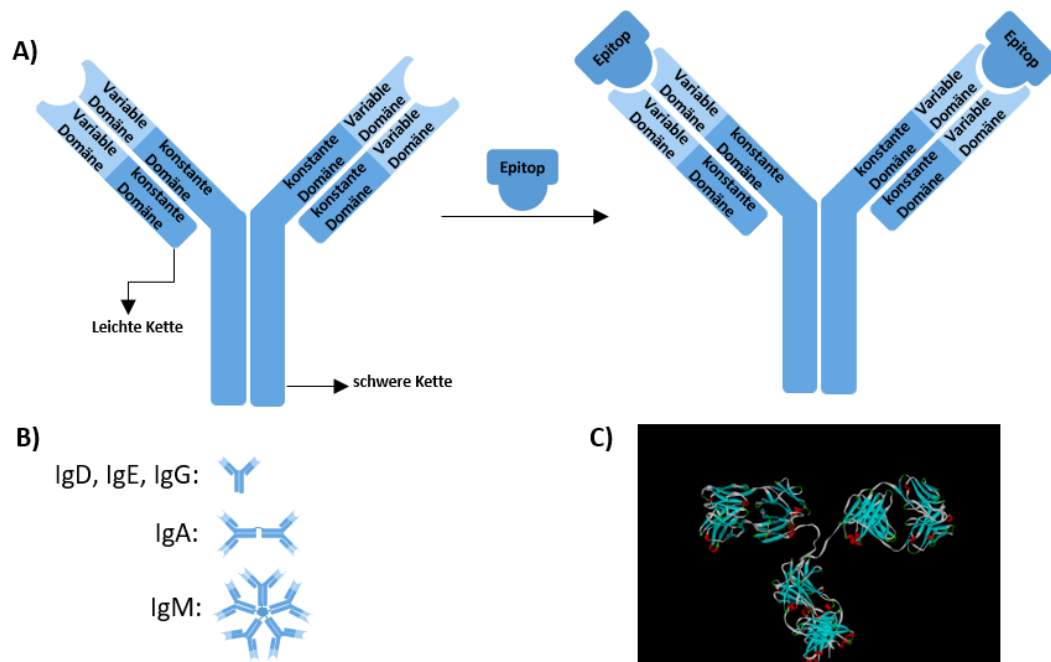


Abbildung 60: A) Schematische Darstellung eines Y-förmigen IgG-Antikörpers und die spezifische Bindung eines Epitops an die Antigenbindungsstelle, welche durch die Bindung beider variablen Domänen bzw. konstanter Domänen von schwerer und leichter Kette gebildet wird. B) Die fünf verschiedenen Isotypen der Immunoglobuline in Wirbeltieren. C) Röntgenkristallstruktur eines IgG-Antikörpers (PDB: 1IGT).

Die Isotypen IgD, IgE und IgG können also zwei gleiche Epitope binden und aufgrund ihrer Flexibilität so in räumliche Nähe zueinander bringen. Folglich eignen sich Antikörper gut als Templat für eine fluorogene native chemische Peptidverknüpfung

und wurden in diesem Teil der Arbeit als solches verwendet. Hierfür sollte der Anti-FLAG Antikörper als Templatmolekül genutzt werden. Es handelte sich dabei um einen monoklonalen Antikörper, welcher das Oktamer DYKDDDDK als Epitop (FLAG-Epitop) bindet. Der Anti-FLAG Antikörper ist in der Lage diese Peptidsequenz sowohl als C- als auch N-terminale Sequenz eines längeren Peptides zu binden. Tritt das Epitop intern in einem Binder auf, kann es auch vom Anti-FLAG-Antikörper gebunden werden.

4.5.1 Durchführung der Antikörper-Templat vermittelten NCL/fNCL

Zuerst sollte die durch den Anti-Flag Antikörper beschleunigte native chemische Peptidverknüpfung mit den Cysteinylopeptiden **125** und **126** und Thioester **124** untersucht werden. **125** trägt Cystein am N-Terminus. Das Peptid **126**, trägt das Cystein am C-Terminus. Peptid **125** und **126** wurden nach Fmoc-Strategie und **124** nach Boc-Strategie synthetisiert. Alle drei Peptide bestehen aus der FLAG-Epitop-Sequenz (Abbildung 61).



Abbildung 61: Cysteinylopeptide **125** und **126**, welche N- und C-terminal, mit dem FLAG-Epitop markiert sind. Thioester **124**, welches mit dem FLAG-Epitop markiert ist.

Die Bedingungen der Abspaltung von **124** vom MBHA-Harz mit TFMSA mussten optimiert werden, um das gewünschte Produkt zu erhalten. Es zeigte sich das die übliche Abspatlösung TFA/m-Kresol/TFMSA 80:5:15 (15% TFMSA) nicht das gewünschte Peptid hervorbrachte. Wurden 15% TFMSA in der Abspatlösung verwendet, konnte nach 2 h lediglich die mehrfache Eliminierung von Wasser beobachtet werden. Dies lässt sich auf die säurekatalysierte Aspartimidbildung zurückführen (Abbildung 62 A). Die Abspaltzeit wurde deswegen auf 30 min verkürzt und die Menge an verwendeter TFMSA wurde von 15% auf bis zu 5% verringert.

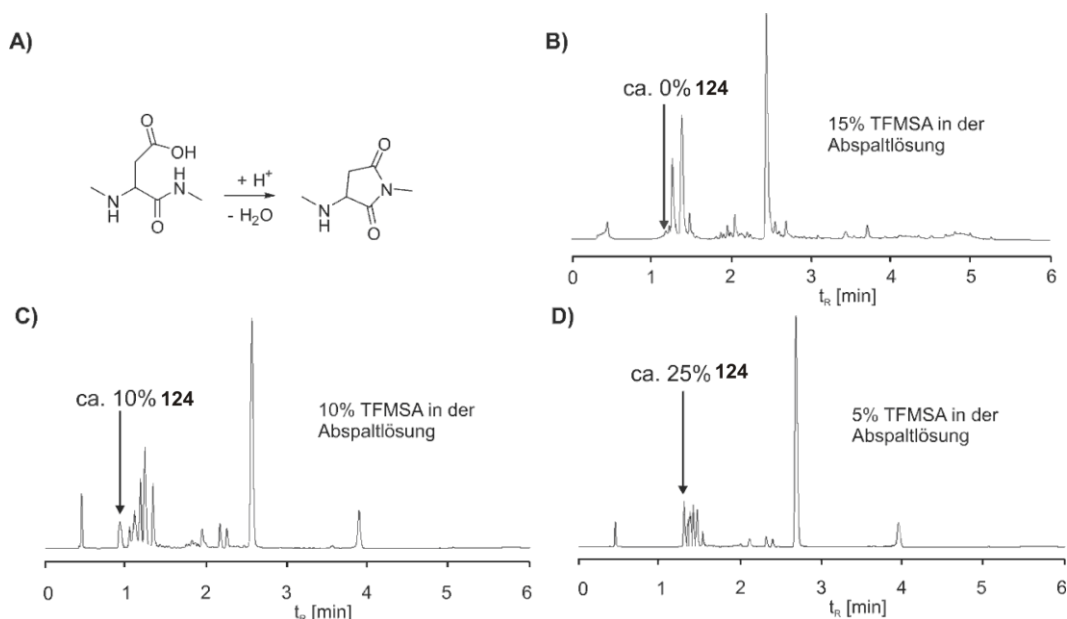


Abbildung 62: A) Ausbeuten von **124** bei verschiedenen Konzentrationen von TFMSA in der Abspaltungslösung. B) Chromatogramm des unaufgereinigten Abspaltprodukts von **124** mit 15% TFMSA. C) Chromatogramm des unaufgereinigten Abspaltprodukts von **124** mit 10% TFMSA. D) Chromatogramm des unaufgereinigten Abspaltprodukts von **124** mit 5% TFMSA.

Abbildung 62 B), C) und D) zeigte sich, dass mit sinkender TFMSA-Konzentration die Ausbeute von **124** stieg. Dabei wurde die Ausbeute von **124** von anfangs 0% (bei 15% TFMSA) auf 25% mit der Verwendung von 5% TFMSA erhöht (Abbildung 62 A). Es ist offensichtlich, dass diese Methode keine gute Synthese für **124** ist. Sowohl mit Basen, wie Piperidin bei der Fmoc-Synthesestrategie, als auch mit starken Säuren, neigt Asparaginsäure in der Festphasenpeptidsynthese zur Aspartimidbildung. Durch eine Verringerung der Temperatur während der Abspaltung von Harz, hätte sie Ausbeute von **124** erhöht werden können. Ebenfall kann der Aminosäure Baustein Boc-Asp(OcHex)-OH verwendet werden, um die Aspartimidbildung zu verringern.²⁷⁶ Da jedoch durch die Verwendung geringerer Anteile TFMSA im Abspaltmix schon ausreichend **124** erhalten wurde, konnte auf eine weitere Optimierung der Peptidsynthese verzichtet werden.

Der Thioester **124** konnte mit den C-terminalen und N-terminalen Cysteinylopeptiden **125** und **126** zur Reaktion gebracht werden. Bei der NCL von **124** mit **125** war das Reaktionsprodukt **127** und bei der Reaktion von **124** mit **126** das Reaktionsprodukt **128** zu erwarten (Abbildung 63). Die Reaktionen wurden bei Peptidkonzentrationen von 50 µM und 10 µM in An- und Abwesenheit des Anti-FLAG-Antikörpers und bei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur, 37 °C) durchgeführt. Der Anti-FLAG-Antikörper konnte das FLAG-Epitop sowohl als N-terminale Sequenz (in **126**), als auch

als C-terminale Sequenz (in **125**) erkennen. Da die folgenden NCLs nicht fluorogen waren, wurden die Ausbeuten der Verknüpfungsreaktionen mittels UPLC-MS überwacht.

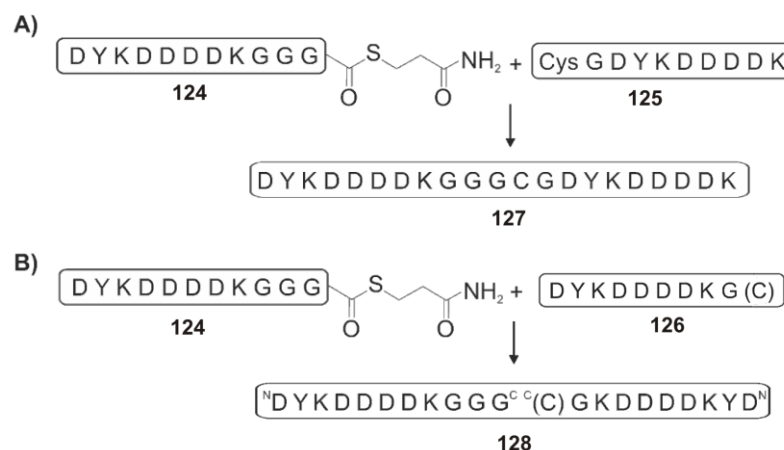


Abbildung 63: Modellpeptide zur Antikörper-gesteuerte NCL. Puffer: 100 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 50% Glycerin, 2 mM TCEP pH 7.4.

Tabelle 2: Aufführung der verschiedenen Reaktionsausbeuten von Thioester **124** und Cysteinylopeptide **125** in einer nativen chemischen Peptidverknüpfung unter variierender Peptid- und Antikörperkonzentration und unterschiedlichen Reaktionstemperaturen. Puffer: 10 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 50vol% Glycerin, 2 mM TCEP, pH 7.4.

Eintrag	125 [μM]	124 [μM]	Antikörper [μM]	Temperatur	Ausbeute 127 [%]
1	50	50	-	r.t.	10.5
2	50	50	-	37°C	41.0
3	10	10	-	r.t.	1.8
4	10	10	-	37°C	4.1
5	50	50	6.25	r.t.	6.6
6	50	50	6.25	37°C	6.6
7	10	10	6.25	r.t.	0
8	10	10	6.25	37°C	0

Tabelle 2 zeigt die unterschiedlichen Peptid- und Anti-FLAG-Antikörperkonzentrationen, die für die fNCL verwendet wurden. Dabei zeigte sich wie erwartet, dass bei höheren Konzentrationen die Ausbeute von **127** nach 180 min Reaktionszeit erhöht war (Tabelle 2, Eintrag 1). Durch die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37°C konnte die Ausbeute im selben Zeitraum bei 50 μM Peptidkonzentration um 300% (Tabelle 2 Eintrag 1 und 2) und bei 10 μM um 230%

(Tabelle 2 Eintrag 3 und 4) gesteigert werden. Nun sollte untersucht werden, ob der Anti-FLAG-Antikörper als Templat für die Peptide **124** und **125** verwendet werden kann. Hierzu wurde der Anti-FLAG-Antikörper zur Reaktionsmischung aus **124** und **125**, gegeben. Auch diese Reaktionen wurden bei Raumtemperatur und 37°C durchgeführt. Die erhöhte Temperatur wurde gewählt, um eine hohe Flexibilität in der Hinge-Region der Antikörper zu erreichen. Hier wurde der FLAG-Antikörper zur Reaktionsmischung, bestehend aus den Peptiden **124** und **125** gegeben. Bei den Peptidkonzentrationen von 50 μM und 10 μM wurden je eine Konzentration von 6.25 μM Antikörper zugegeben

Tabelle 3: Aufführung der verschiedenen Reaktionsausbeuten von Thioester **26** und Cysteinylpeptide **28** in einer nativen chemischen Peptidverknüpfung unter variierender Peptid- und Antikörperkonzentration und unterschiedlichen Reaktionstemperaturen. Puffer: 10 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 50vol% Glycerin, 2 mM TCEP, pH 7.4.

Eintrag	126 [μM]	124 [μM]	Antikörper [μM]	Temperatur	Ausbeute 128 [%]
1	50	50	-	r.t.	15.9
2	50	50	-	37°C	36.0
3	50	50	6.25	r.t.	7.3
4	50	50	6.25	37°C	5.4

Die Experimente zeigten, dass die Zugabe der Antikörper die NCL zwischen Peptiden **124** und **125** keinesfalls beschleunigt. Die Antikörper-Templat-gesteuerten Reaktionen zeigten bei allen Peptidkonzentrationen und Reaktionstemperaturen geringere Ausbeuten als bei den bereits analysierten NCLs, welche nicht Antikörper-Templat vermittelt waren. Bei Raumtemperatur sank die Ausbeute bei 50 μM Peptidkonzentration zum selben Zeitpunkt um 38% auf 6.6% (Tabelle 2 Eintrag 5). Bei 10 μM Peptidkonzentration sank diese Ausbeute sogar um 100% auf 0% (Tabelle 2, Eintrag 6) nach 180 min. Bei 37°C Reaktionstemperatur sank die Ausbeute bei 50 μM um 84% auf 6.6% (Tabelle 2, Eintrag 7). Bei einer Peptidkonzentration von 10 μM ist ebenfalls wieder ein Absinken der Ausbeute um 100% auf 0% (Tabelle 2, Eintrag 8) zu beobachten. Bei einem höheren Stoffmengenanteil des Antikörpers sank die Ausbeute der Antikörper-Templat gesteuerte NCL also stärker als bei einem niedrigeren Stoffmengenanteil. Ein gleicher Trend ließ sich für die jeweils verwendete Reaktionstemperatur beobachten. Hier sank die Ausbeute bei der Verwendung von Antikörpern bei einer Reaktionstemperatur von 37°C stärker als bei Raumtemperatur (r.t.). Dies war ein Hinweis darauf, dass die FLAG-Epitope in der Lage sind am

Antikörper zu binden. Die sinkenden Ausbeuten deuteten darauf hin, dass die NCL zwischen den beiden Peptiden **124** und **125** durch die Anwesenheit der Antikörper direkt verhindert wurde. Bei der Reaktion von Thioester **124** mit dem C-terminalen Cysteinylopeptid **126** zeigt sich ein Ähnliches Ergebnis. Bei einer Peptidkonzentration von 50 μM zeigt sich ein ähnliches Reaktionsverhalten. Durch die Zugabe des Anti-FLAG-Antikörpers sinken die Ausbeuten des Reaktionsprodukts **128** bei Raumtemperatur und bei 37 °C (Tabelle 3).

Die sinkenden Reaktionsausbeuten können dadurch erklärt werden, dass die gebundenen FLAG-Epitope durch die Größe der Antikörper so weit voneinander separiert werden, dass sie keine Reaktion mehr eingehen können. Eine Abmessung der Röntgenkristallstruktur eines IgG-Antikörpers ergibt, dass die Bindungsstellen im 180° gestreckten Zustand bis zu 156 Å auseinander liegen (vgl. Abbildung 60 C). Dieser Wert entspräche dem maximal möglichen Abstand, welchen die Bindungsstellen in einem Anti-FLAG-Antikörper annehmen können. Ein Winkel von 0° würde ein Abstand der Bindungsstellen von 0 Å entsprechen. Der mittlere Abstand über alle möglichen Winkel beträgt 90°. Bei einem Winkel von 90° zwischen den Bindungsarmen wäre der Abstand zwischen den Bindungsstellen allerdings immer noch bis zu 110 Å groß. Das ist eine grobe Schätzung, die auf der Abmessung der Länge der Antikörperarme unter Zuhilfenahme des Satz des Pythagoras beruht. Damit eine fluorogene Antikörper-vermittelte NCL ablaufen kann, müssen die reaktiven Gruppen beider Peptide **124** und **125/126** am Templat räumlich einander annähert werden. Die Resultate der NCL-Reaktionen deuten darauf hin, dass die Flexibilität der Hinge-Region nicht ausreicht, um die reaktiven Enden der Peptide **124** und **125/126** für eine Reaktion anzunähern.

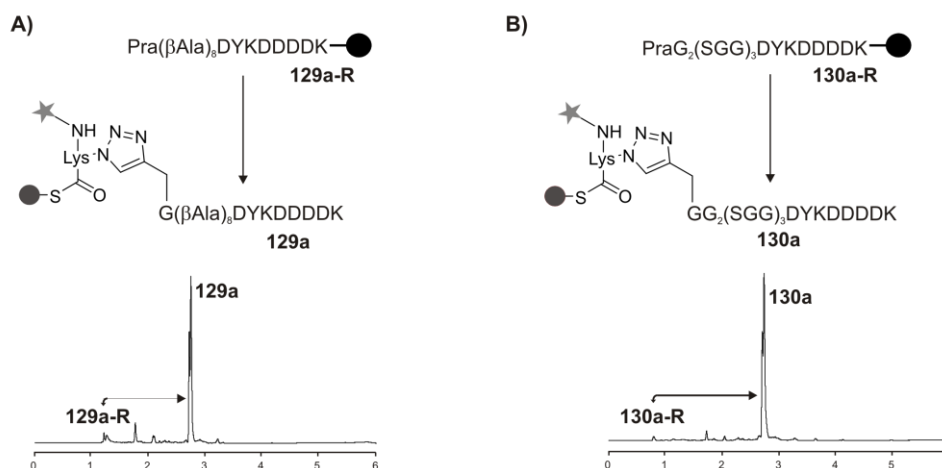


Abbildung 64: **A)** Synthese der durch β -Alanin verlängerte N-terminale Thioester mit Hilfe der Click-Reaktion durch das fluorogene Monomer **123**. Die Reaktion vom harzgebundenen Pra(β Ala)₈DYKDDDDK kann exemplarisch für die mit β -Alanin verlängerten fluorogenen Thioester angesehen werden. **B)** Synthese der durch SG-Sequenzen verlängerte N-terminale Thioester mit Hilfe der Click-Reaktion durch das fluorogene Monomer **123**. Die Reaktion vom harzgebundenen PraG₂(SGG)₃DYKDDDDK ist exemplarisch für alle weiteren durch SGG-Segmente fluorogenen Thioestern. **C)** UPLC-Chromatogramm der unaufgereinigten Abspaltung der Click-Reaktion des am Harz gebundenen Pra(β Ala)₈DYKDDDDK. **D)** UPLC-Chromatogramm der unaufgereinigten Abspaltung der Click-Reaktion des am Harz gebundenen PraG₂(SGG)₃DYKDDDDK.

Die reaktiven Peptide werden so modifiziert, dass zwischen den reaktiven N-terminalen Cysteinen, dem C-terminalen Thioester und den entsprechenden FLAG-Epitop verschiedene Linker eingebaut wurden. So sollen die ermittelten Distanzen der Bindungsstellen im Antikörper überwunden werden. Es wurden Poly- β -Alanin (Abbildung 64 A) und SGG-Peptidsequenz-Segmente (Abbildung 64 B) verwendet. Beide Linker sollten dem random-coil Strukturmotiv folgen und kommen derart auch häufig in der Natur vor. Aufgrund ihrer random-coil Struktur, kann nun die Konturlänge und die mittlere Länge der Linker berechnet werden. Die Konturlänge entspricht der Maximallänge, welche ein Polymer hätte, wenn es vollkommen gestreckt wäre (Tabelle 4). Dabei wurde die Länge einer β -Alanin-Einheit mit 5 Å in dem Programm ChemBio3D Ultra abgemessen. Die Länge einer Aminosäure im SGG-Segment wurde mit 3.81 Å abgeschätzt.²⁷⁷

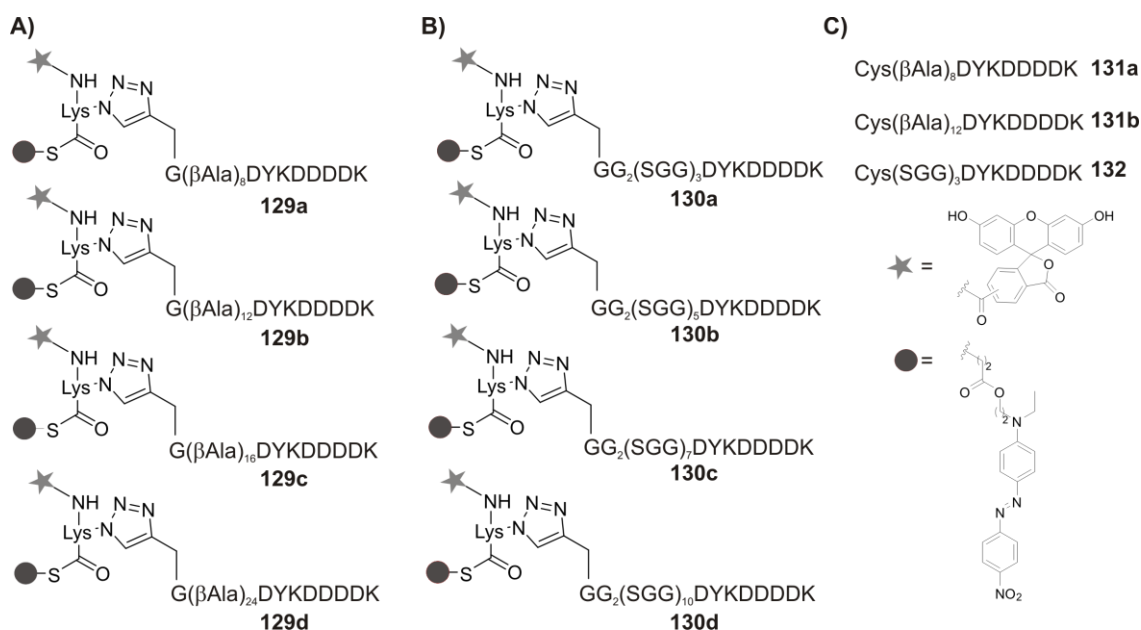


Abbildung 65: A) FLAG-Epitopsequenzen, welche mit einem fluorogenen Thioester markiert sind und durch einen Linker von βAla_8 (**129a**), βAla_{12} (**129b**), βAla_{16} (**129c**) und βAla_{24} (**129d**). B) FLAG-Epitopsequenzen, welche mit einem fluorogenen Thioester markiert sind und durch einen Linker von SGG_3 (**130a**), SGG_5 (**130b**), SGG_7 (**130c**) und SGG_{10} (**130d**). C) Cystein markierte FLAG-Epitopsequenzen, welche die Linker βAla_8 (**131a**), βAla_{12} (**131b**) und SGG_3 (**132**) enthalten. Der Fluorogene Thioester wird durch die räumliche Nähe von 5/6-Carboxyfluoreszein (grauer Stern) und Dispers Rot (gefüllter Kreis) erzeugt.

Die reaktiven fluorogenen Thioester **129a-d** und **130a-d** wurden mithilfe des fluorogenen Azid-Monomers **123** hergestellt (vgl. Abbildung 65). Die Cysteinylpeptide mit dem Poly- β -Alanin Linkern und den SGG-Segmenten wurden nach dem Fmoc-Protokoll aufgebaut. Aufgrund der einfacheren Synthese wurde der Thioester am N-Terminus platziert. Diese Anordnung sollte die Bindung des FLAG-Epitops am Antikörper nicht stören, da der FLAG-Antikörper die FLAG-Sequenz DYKDDDDK sowohl N-terminal, C-terminal, als auch intern erkennt. Hierzu wurden die Peptide N-terminal mit Propargylglycin modifiziert. Durch CuI in DMF konnten die fluorogenen Peptidthioester mit Hilfe von **123** erzeugt werden. Hier zeigte sich auch ein Vorteil dieser Thioestersynthese (Abbildung 64 A, B). Da zwischen den Kupplungsschritten in der automatisierten Peptidsynthese die nicht abreagierten freien N-termini mit Essigsäureanhydrid blockiert wurden, konnte sichergestellt werden, dass nur die gewünschte Volllängeensequenz um ein Propargylglycin erweitert wurde. So konnte auch nur das Volllängenpeptid über die CuAAC mit **123** modifiziert werden. Aufgrund des starken hydrophoben Charakters von **123** verschob sich die Retentionszeit des gewünschten Zielpetids stark zu höheren Retentionszeiten (Abbildung 64). So konnten diese Peptide problemlos von den Abbruchsequenzen separiert werden.

Tabelle 4: Übersicht der Konturlängen und den mittleren Längen der Verlängerungsmotive β Ala und SGG bei ihrer entsprechenden Anzahl wie sie in den Verbindungen vorkommen.

	Länge [Å]			
	8 β Ala	12 β Ala	16 β Ala	24 β Ala
Konturlänge	40 Å	60 Å	80 Å	120 Å
Mittlere Länge	14 Å	17 Å	20 Å	25 Å

	Länge [Å]			
	3 SGG	5 SGG	7 SGG	10 SGG
Konturlänge	34 Å	57 Å	80 Å	114 Å
Mittlere Länge	11 Å	14.8 Å	18 Å	21 Å

Die Antikörper-Templat-mediierten NCL wurden bei einer Peptidkonzentration von 1 μ M durchgeführt. So wurde der Antikörper auch entsprechend bei einer Konzentration von 1 μ M hinzugefügt (Abbildung 66 A). Es wurden die absoluten Fluoreszenzintensitäten bei einer Reaktionszeit von 180 min beobachtet und verglichen. Als Hintergrundreaktion wurde der Thioester alleine im wässrigen Reaktionspuffer und der hydrolysierte Thioester wurde zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenzintensität vermessen. Es wurde deutlich, dass alle vermessenen Kombinationen von Cysteinylpeptiden und Thioestern keinen Unterschied in den Fluoreszenzintensitäten zwischen der NCL in Abwesenheit und in Anwesenheit der Antikörper ergaben (Abbildung 66 B, C, D). Aufgrund dieser Ergebnisse sollte nun durch HPLC-Experimente untersucht werden, ob die NCL zwischen den beschriebenen Peptiden generell ablaufen kann. Hierzu wurden die β -Alanin-Cysteinylpeptide mit den entsprechenden Thioestern mit β -Alanin-Linkern zur Reaktion gebracht. Die Reaktion wurde bei einer Peptidkonzentration von 1 mM durchgeführt, um die eine gute Überwachung mit Hilfe der UPLC zu gewährleisten. Die entsprechenden Chromatogramme der Reaktionen zeigen nach 180 min alle die Bildung eines Produktpeaks. Dies konnte mit Hilfe der Bestimmung der molekularen Masse bei der entsprechenden Retentionszeit eindeutig nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 76 bis Abbildung 83). Allerdings wurden sehr geringe Ausbeuten von 10%-33% der Reaktionsprodukte beobachtet. Die vergleichbare Reaktion von **106** mit **107** (vgl. Abbildung 38 in Abschnitt 4.2.1) bei einer Peptidkonzentration von 1 mM zeigte eine Ausbeute von 36% nach 180 min. Das deutet darauf hin, dass Monomer **123** in den

Thioestern **129a-d** eine langsamere Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge hat. Da die fNCL ohne Anwesenheit des Antikörpers dennoch stattgefunden hat, kann angenommen werden, dass die Einführung der Linker (β -Ala, SGG) nicht ausreicht, um die Distanz der reaktiven Gruppen nach der Bindung am Antikörper zu überwinden.

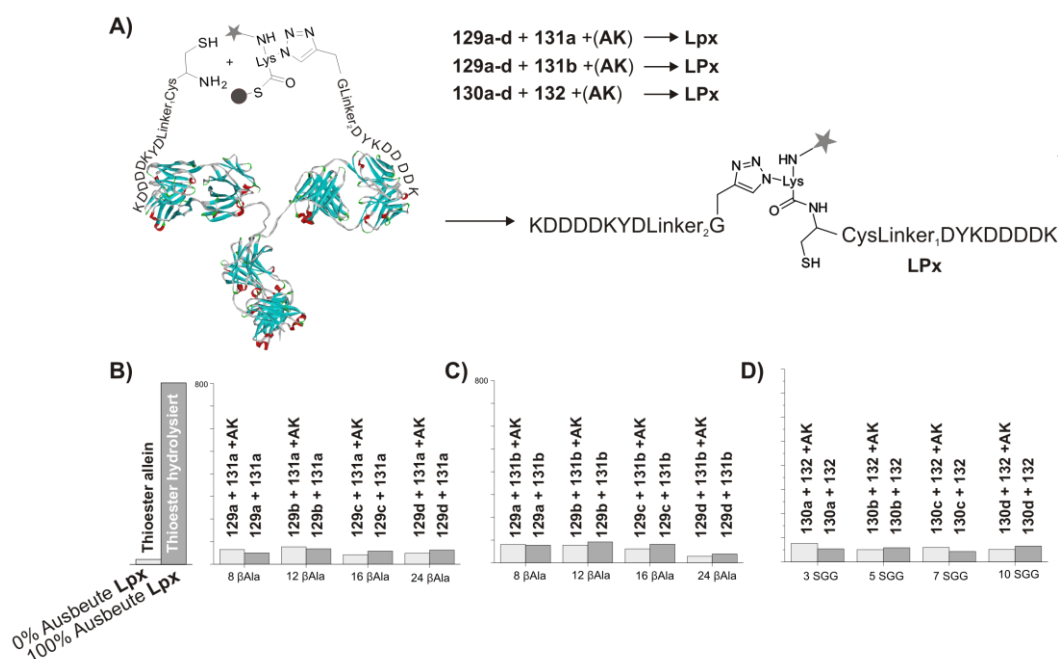


Abbildung 66: A) Darstellung der N-terminal mit Cystein modifizierten und N-terminal als fluorogenen Thioester modifizierten FLAG-Epitope, welche durch die Variation von Linker₁ und Linker₂ in ihrer Länge variieren und durch die Anwesenheit des Anti-FLAG-Antikörpers durch ihre räumliche Nähe zum Reaktionsprodukt **LPx** reagieren. B) Fluoreszenzintensitäten der Thioester **129a**, **129b**, **129c** und **129d** mit Cysteinylopeptid Cys(β Ala)₈DYKDDDDK **131a** in An- und Abwesenheit des FLAG Antikörpers. Zusätzlich sind der Hintergrund (Thioester allein) und die zu erwartende Maximalfluoreszenz (hydrolysierte Thioester) gezeigt. C) Fluoreszenzintensitäten der Thioester **129a**, **129b**, **129c** und **129d** mit Cysteinylopeptid Cys(β Ala)₁₂DYKDDDDK **131b** in An- und Abwesenheit des FLAG Antikörpers. D) Fluoreszenzintensitäten der Thioester **130a**, **130b**, **130c** und **130d** mit Cysteinylopeptid Cys(SGG)₃DYKDDDDK **132** in An- und Abwesenheit des FLAG Antikörpers. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 525 nm bestimmt.

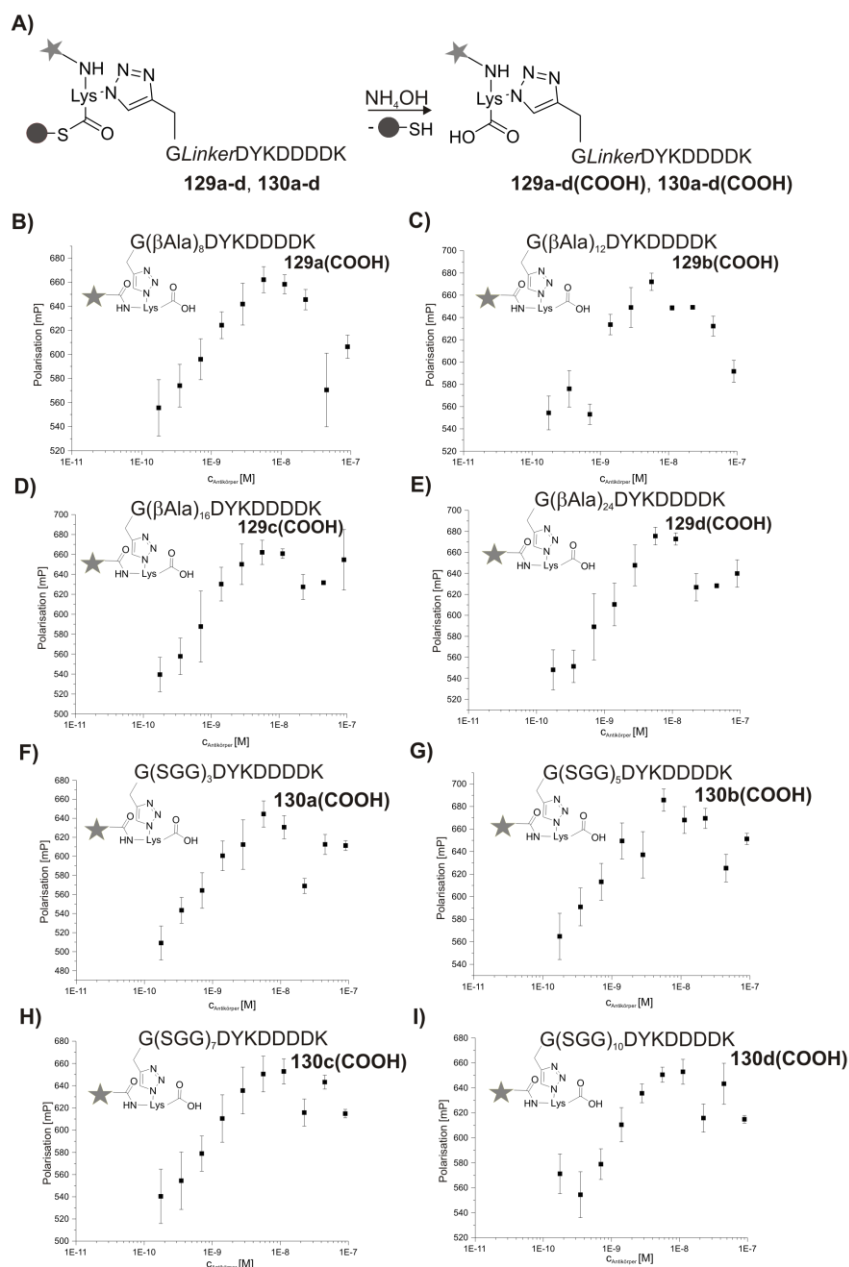


Abbildung 67: A) Ammoniakalische Hydrolyse der durch den Linker unterschiedlich lange FLAG-Peptid-Thioester zur Durchführung eines Fluoreszenzpolarisationsassays. Resultate des Fluoreszenzpolarisationsassays für die Verbindungen B) 129a(COOH), C) 129b(COOH), D) 129c(COOH), E) 129d(COOH), F) 130a(COOH), G) 130b(COOH), H) 130c(COOH) und I) 130d(COOH).

Da ausgeschlossen wurde, dass die durch CuAAC synthetisierten Peptidthioestern nicht in der Lage seien eine NCL durchzuführen, sollt noch untersucht werden ob die Peptide überhaupt die Antikörper binden können. Dies geschah mit Hilfe eines Fluoreszenzpolarisationsassays. Hierzu wurde ein fluoreszierender Binder benötigt. Hierzu wurden sämtliche β -Ala- und SGG-Thioester hydrolysiert und bei einer Konzentration von 0.3 nM in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Der Antikörper wurde in einem Konzentrationsbereich von 0.18 nM bis 90 nM in zehn Kavitäten pipettiert.

Anschließend wurde die Fluoreszenzpolarisation bestimmt. Alle synthetisierten Binder zeigen bei geringer Antikörper-Konzentration eine geringe Fluoreszenzpolarisation. Durch die Zugabe von Antikörper in erhöhter Konzentration steigt die Polarisation des entstehenden Fluoreszenzlichts. Die Polarisation erreicht bei hohen Antikörperkonzentrationen schließlich ein Plateau (Abbildung 67). Als Ausnahme stechen hierbei die Binder **129a(COOH)** und **129b(COOH)** heraus. Jedoch kann auch hier der Trend der steigenden Polarisation bei steigender Antikörperkonzentration beobachtet werden.

Die erhöhte Fluoreszenzpolarisation konnte durch die Bindung der fluoreszierenden Binder an den Antikörper erklärt werden. Bei geringen Konzentrationen des Antikörpers ist das entstehende Fluoreszenzlicht der Binder eher depolarisiert, was sich in einem geringen Wert der Polarisation äußert. Die Bindung an ein Molekül mit hoher molekularen Masse, wird die Rotation fluoreszierender Binder eingeschränkt. Dadurch erscheint das entstehende Fluoreszenzlicht eher polarisiert, was sich in einem hohen Wert der Polarisation äußert. Zusammenfassend zeigt dieses Experiment qualitativ, dass die synthetisierten FLAG-Peptide in der Lage waren den verwendeten Antikörper zu Binden. Es konnte also ausgeschlossen werden, dass die fluorogene Antikörper-Templat-medierte NCL nicht durch die mangelnde Bindung der FLAG-Peptide am Antikörper unterbunden wurde.

Abschließend sollte überprüft werden, ob die Integrität des Antikörpers unter den Bedingungen des Puffers erhalten blieb. Da der Reaktionspuffer das Disulfid-reduzierende Reagenz TCEP enthielt, besteht die Möglichkeit das die Gelenkregion im Antikörper strukturell zerstört wurde. In dieser Region werden beide schwere Ketten über zwei Disulfid-Brücken miteinander verbunden. Eine Spaltung dieser Disulfid-Brücken hätte zur Folge, dass der Antikörper in kleinere Fragmente zerfallen würde. Die Bindungsstellen wären so nicht mehr in räumlicher Nähe zueinander lokalisiert. Der Antikörper könnte so auch nicht mehr als gewünschtes Templat agieren. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde der Antikörper für 180 min im Reaktionspuffer mit und ohne TCEP zur Reaktion gebracht. Zum Nachweis kleinerer Peptidfragmente wurde ein natives Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Die Bahnen bei 0h lassen jeweils eine Bande im Bereich >130 kDa erkennen. Bei dieser Bande handelte es sich wohl um den untersuchten Antikörper, da dieser eine molare Masse von 160 kDa aufweist. Zu diesem Zeitpunkt kann keine Bande im Bereich der kleineren Fragmente ausgemacht werden. Auch nach 180 min konnten bei gleichen Reaktionsbedingungen keine

Proteinfragmente im Massenbereich von <130 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 75). Wieder zeigte sich hier die Anwesenheit einer Bande im Massenbereich von >130 kDa. Der Antikörper scheint also im gegebenen Puffer mit TCEP als Reagenz stabil zu sein.

Schließlich musste für das Ausbleiben der Templat-geteuerten NCL wohl doch der zu große Abstand der beiden Bindungsstellen im Antikörper in Betracht gezogen werden. Um diese Hypothese zu untersuchen, soll im folgenden Abschnitt mit Hilfe eines Abstandsscreenings an einem Modelsystem eine mögliche räumliche Abstandsgrenze zwischen zwei Bindungsstellen in einem Templatmolekül bestimmt werden, die kein Templat-Effekt mehr beobachten lässt.

4.6 Abstandsscreening mit Hilfe der fNCL

Aufgrund der geringen Ausbeuten der durch ein Antikörper-Templat vermittelten NCL, soll nun eine abstandsabhängige NCL genauer untersucht werden. Es wurde bereits gezeigt, dass über die selbstreinigende Peptidthioestersynthese, aber auch über die CuAAC hergestellte fluorogene Peptidthioester eine Peptid-Templat-gesteuerte fNCL möglich ist. Da die Bindung der FLAG-Mercaptopropionsäure-Thioester an den Antikörpern vermutlich zu einer Unterbindung der NCL geführt hatte, sollte die Peptid-Templat-gesteuerte fNCL bei unterschiedlichen Abständen der Peptidbindungsstellen durchgeführt werden. So sollte beobachtet werden, inwiefern der Abstand der Templat-bindenden Peptide einen Einfluss auf den Ablauf der NCL hat. Da die Abstände der beiden FLAG-bindenden Segmente im Antikörper sehr groß waren, kann dies der entscheidende Grund für den nicht erfolgreichen Ablauf der oben beschriebenen fluorogenen NCL sein.

Es wurde bereits in Abschnitt 4.3.2 gezeigt, dass die Fluorometrie in der Lage ist eine fluorogene NCL bei geringen Konzentrationen in Echtzeit zu überwachen. In den folgenden Experimenten wird eine Peptidkonzentration von 5 μM gewählt. Um die Bildung von Coiled-coil-Komplexen bei geringeren Konzentrationen zu erhöhen, wurde die Anzahl der Coil-Segmente erhöht. Für die Coil-Segmente des Templates wurde die Sequenz (EIAALEK)₆ gewählt. Für die Coil-Segmente für die Templat-bindenden Sequenzen wurde (KIAALKE)₃ gewählt. Die Cysteinylopeptide **135a-c** und Template **133a-c** wurden nach der Fmoc-Strategie synthetisiert. Die Synthese der fluorogenen Peptidthioester **134a-c** erfolgte nach der bereits beschriebenen Peptidthioestersynthese mit Selbstreinigung. Die Reaktion zwischen den fluorogenen Peptidthioester **134a** und Cysteinylopeptid **135a** in Abwesenheit eines Templates zeigt nur eine geringe Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Nach 180 min zeigt die Fluoreszenzintensität eine Ausbeute von 2% an (Abbildung 68). Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte durch die Bestimmung der maximalen Fluoreszenzintensität des hydrolysierten Thioesters, welcher durch die Hydrolyse mit NH_4OH von **133a** erhalten wurde (100% in Abbildung 68 B). Die Templat-unabhängige Reaktion zwischen **134a** und **135a** zeigt wie in Abschnitt 4.2.1, auch mit der Vergrößerung der Coil-Segmente, eine geringe Reaktionsgeschwindigkeit. Durch die Zugabe von einem Äquivalent des größenangepassten Templates **133a** erhöht sich die Reaktivität zwischen den beiden

Peptiden erheblich. Das erhöhte Fluoreszenzsignal nach 180 min der Templat-gesteuerten NCL zeigt eine Ausbeute von 75% des fluoreszenten Ligationsprodukts an.

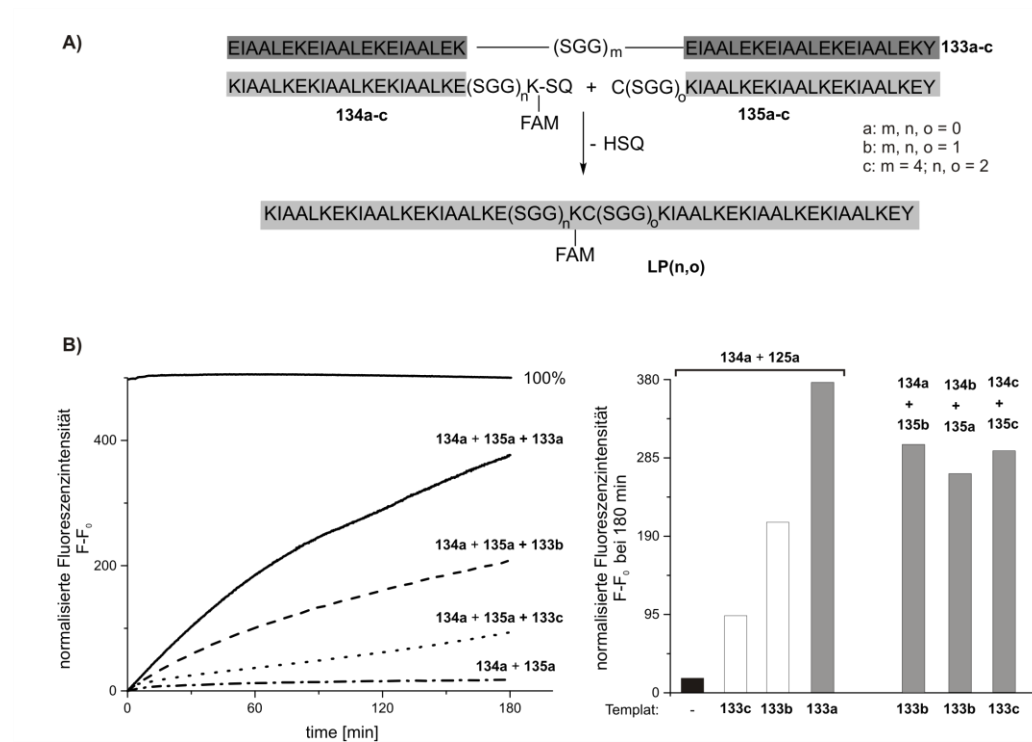


Abbildung 68: **A)** Variation der Linker in der nativen chemischen Peptidverknüpfung zwischen den Thioestern **134a-c** und den Cysteinylpeptiden **135a-c** in Anwesenheit der Template **133a-c**. m, n und o zeigen die Anzahl der Wiederholungen der SGG-Segmente an. **B)** Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Templatlänge in der Reaktion von **134a** mit **135a**. **C)** Fluoreszenzintensitäten nach 180 min nach der Reaktion zwischen Thioester und Cysteinylpeptid in Abwesenheit eines Templats (schwarzer Balken), in Anwesenheit eines Templats unpassender Größe (weiße Balken) und in Anwesenheit eines Templats passender Größe (graue Balken). Die Fluoreszenzintensität wurde bei 525 nm bestimmt.

Um den Einfluss des Abstands in der Coiled-coil-vermittelten Ligation zu untersuchen, wurde die Entfernung zwischen den beiden Bindungsstellen in den Templaten **133b-c** schrittweise erhöht. Hierzu wurden SGG-Segmente verwendet, da diese keine bestimmte Sekundärstruktur aufweisen. Die Einführung eines SGG-Segments in Templat **133b** ließ die Ausbeute der Reaktion zwischen **134a** und **135a** in Anwesenheit dessen nach 180 min um 34% absinken (Abbildung 68). Ein noch stärkeres Absinken konnte durch die Einführung von 4 SGG-Segmenten beobachtet werden (**133c**). Verglichen mit der NCL mit den größenangepassten Templat sank die Fluoreszenzintensität hier um 71%. Der Vergleich der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Reaktion von **134a** mit **135a** mit der, mit dem größenangepassten Templat **133a** (**134a** + **135a** + **133a**; Abbildung 68) deuteten auf eine 48-fache Vergrößerung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit hin. Diese fällt auf eine 8-fache Vergrößerung, wenn der Abstand der beiden Peptidbindungsstellen in Templat **133c** um 12 Aminosäuren bzw. 4 SGG-Segmente erhöht wurde. Eine

wahrscheinliche Erklärung hierfür war, dass die SGG-Segmente die effektive Molarität durch eine Erhöhung des Abstands zwischen den reaktiven Gruppen im ternären Coiled-coil-Komplex **133c**·**134a**·**135a** verringerten. Zudem konnte ebenfalls die Flexibilität der SGG-Segmente einen Kontakt zwischen den reaktiven Gruppen der Templat gebundenen Peptide verhindern. Dies erklärte zudem, dass durch die durch SGG-Segmente verlängerte Template dennoch die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit verbessern, jedoch mit einer geringeren Effektivität als das größenangepasste Templat. Eine alternative Erklärung ist, dass die Einfügung der SGG-Segmente eventuell die Stabilität des ternären Coiled-coil-Komplex beeinflusst. Als Ergebnis könnten die Peptid-Templat ihre Affinität für **134a** und **135a** verlieren. Dies würde sich ebenfalls in einen Abfall der Reaktivität deutlich machen.

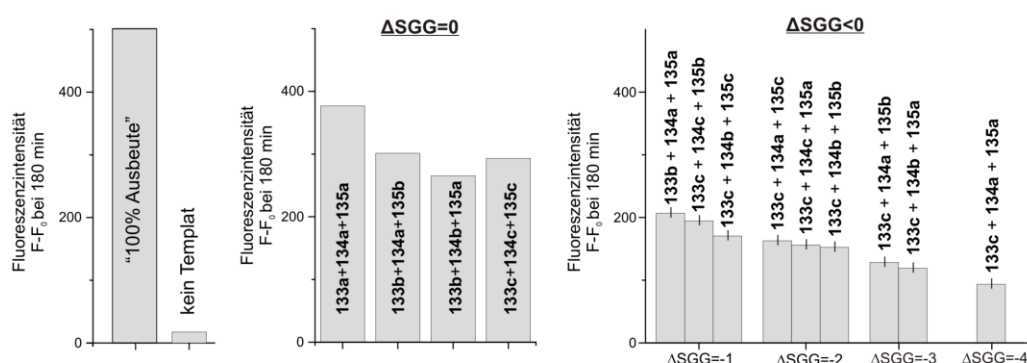


Abbildung 69: Abhängigkeiten der Fluoreszenzintensitäten der Reaktionen von Thioestern und Cysteinylpeptiden in Anwesenheit eines unpassenden Templats. Template mit $\Delta\text{SGG} < 0$ sind zu lange Template welche zur „Passgenauigkeit“ und 1 ($\Delta\text{SGG} = -1$), 2, ($\Delta\text{SGG} = -2$), 3 ($\Delta\text{SGG} = -3$) oder 4 ($\Delta\text{SGG} = 4$) SGG-Segmente zu kurz sind. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 525 nm bestimmt.

Anschließend sollte untersucht werden, ob eine Verlängerung der Peptidthioester **134b-c** und Cysteinylpeptide **135b-c** durch eine gezielte Einführung von SGG-Segmente den vergrößerten Abstand zwischen den Peptidbindungsstellen in den vergrößerten Templaten **133b-c** ausgleichen könnten. Tatsächlich konnte durch die Erweiterung von SGG-Segment am Peptidthioester **134b** oder am Cysteinylpeptid **135b** die Effektivität am Peptidtemplat **133b** verbessert werden. So konnte die Ausbeute der NCL zwischen **134a** und **135a** in Anwesenheit von **133b** durch den Austausch von **134a** mit **134b** von 41% auf 53% erhöht werden. Wurde **135a** durch **135b** ersetzt, erhöhte sich die Ausbeute auf 60%. Die ausgeprägteste Wiederherstellung der Reaktivität konnte bei dem Templat **133c** beobachtet werden. Bei der Reaktion zwischen **134a** und **135a** zeigte sich **133c** als äußerst ineffizientes Templat. Jedoch konnte durch das Hinzufügen von je 2 SGG-Segmenten im Peptidthioester **134c** und Cysteinylpeptid **135c** die Ausbeute nach 180 min von 19% auf 58% erhöht werden. Daraus konnte abgeleitet werden, dass

der beobachtete Verlust an Reaktivität bei den Reaktionen von **134a** und **135a** an den verlängerten Templaten **133b-c** vornehmlich durch die räumliche Trennung der Bindungsstellen der beiden reaktiven Peptide zustande kam. Ein Verlust der Templataffinität der reaktiven Peptide konnte so größtenteils ausgeschlossen werden.

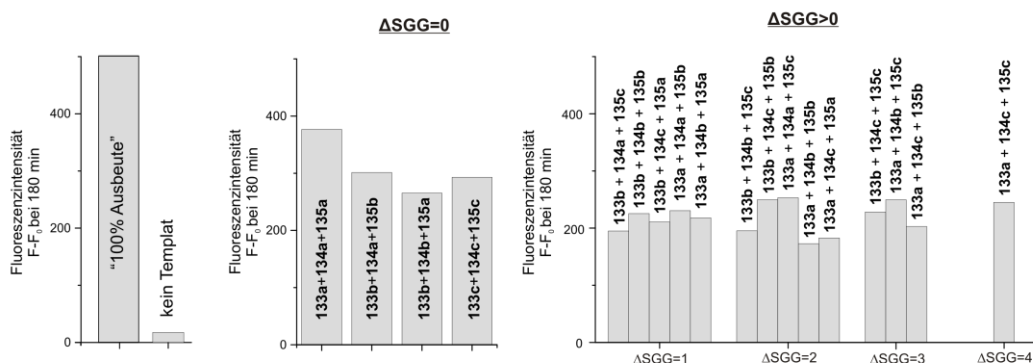


Abbildung 70: Abhängigkeiten der Fluoreszenzintensitäten der Reaktionen von Thioestern und Cysteinylopeptiden in Anwesenheit eines unpassenden Templates. Template mit $\Delta\text{SGG} > 0$ sind zu kurze Template welche zur „Passgenauigkeit“ und 1 ($\Delta\text{SGG}=1$), 2, ($\Delta\text{SGG}=2$), 3 ($\Delta\text{SGG}=3$) oder 4 ($\Delta\text{SGG}=4$) SGG-Segmente zu kurz sind. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 525 nm bestimmt.

Mit den verlängerten Templaten **133b-c** und den verlängerten reaktiven Peptiden **134b-c** und **135b-c** sollte der Effekt der nicht passend ausgerichteten funktionellen Gruppen genauer untersucht werden. In den Templaten **133a-c** wurden die Peptidbindungsstellen durch m ($m = 0, 1, 4$) SGG-Segmente voneinander getrennt. In den Peptiden **134a-c** und **135a-c** waren die funktionellen Gruppen in einen Abstand von n und o ($n, o = 0, 1, 2$) SGG-Segmenten vom Coiled-Coil-Abschnitt getrennt. Zum einfacheren Verständnis wurde der ΔSGG -Wert ($\Delta\text{SGG} = n + o - m$, vgl. Abbildung 68) eingeführt. ΔSGG definiert den Abstand zwischen den funktionellen Gruppen der Templat gebundenen reaktiven Peptide in Vielfachen von SGG-Segmenten an. Negative ΔSGG -Werte zeigen an, dass die Anzahl der SGG-Segmente in den reaktiven Peptiden nicht ausreichend ist, um den ebenfalls durch SGG-Segmente erzeugten Abstand zu überwinden. Templat-gesteuerte Reaktionen mit Überhängen werden durch ein $\Delta\text{SGG} > 0$ beschrieben. Dabei übersteigt die Anzahl der SGG-Segmente an den reaktiven Peptiden die Anzahl jener in den Peptidtemplaten. Insgesamt wurden fünf Reaktionen (Abbildung 70), welche $\Delta\text{SGG} = 1, 2$ annahmen, durchgeführt. Für Werte von $\Delta\text{SGG} = -2, -1$, wurden drei Reaktionen durchgeführt. Für Werte von $\Delta\text{SGG} = -3$ und $\Delta\text{SGG} = -4, 4$ wurden für zwei bzw. eine Reaktionspermutation erhalten. Abbildung 69 zeigt die nach $\Delta\text{SGG} < 0$ gruppierten Reaktion. Wie bereits gezeigt, werden die größten Ausbeuten bei den Reaktionen mit $\Delta\text{SGG} = 0$ erzielt. Die nicht übereinstimmend ausgerichteten funktionellen Gruppen an

zu langen Templaten ($\Delta\text{SGG} = -1$) führen zu einer Abnahme derer Reaktivitäten. Ein ähnliches Verhalten wird auch bei einem Überhang der reaktiven Gruppen um ein SGG-Segment ($\Delta\text{SGG} = 1$) beobachtet werden. Jedoch konnte eine ähnliche Reaktivität erhalten werden, obwohl die Anzahl der SGG-Segmente in den reaktiven Peptiden so erhöht wurde, dass $\Delta\text{SGG} = 2, 3, 4$ wurden (Abbildung 70). Trotz der unpassenden Überhänge zeigten die Templat-medierte Reaktionen eine 12-14-fach höhere Ausbeute als die nicht Templat-gesteuerte Reaktion. Anders verhielt sich die Beziehung zwischen Reaktivität und einem sukzessive erhöhten Abstand der Peptidbindungsstellen am Templat. Die Verlängerung der Template zeigt bei $\Delta\text{SGG} = -2, -3, -4$ ein stetiges Absinken der Reaktionsausbeute. Dieses stetige Absinken der erhaltenen Ausbeute durch die Separierung der reaktiven Gruppen, deuten auf einen Abstand hin, bei welchem keine weitere Beschleunigung der Ligation mehr zu beobachten ist.

Eine lineare Extrapolation zeigt, dass bei der Anzahl von 6.4 SGG-Segmente ($\Delta\text{SGG} = -6.4$) die entsprechende Fluoreszenzintensität der Hintergrundreaktion erreicht wird. Mit Hilfe der Formel für die mittlere quadratischen Länge ($r^2 = N \cdot l^2$) eines Polymers in random coil-Struktur kann der mittlere Abstand berechnet werden ab welchem der Templat-Effekt aussetzt. N entspricht der Anzahl der Aminosäuren, die mit Hilfe der bereits bestimmten 6.4 SGG-Segmente auf 18.9 festgelegt wurde. Die Länge (l) einer Aminosäure wurde mit 3.81 \AA abgeschätzt.²⁷⁷ Daraus kann geschlossen werden, dass bei einem Abstand von 16.6 \AA zwischen den reaktiven Gruppen kein Templat-Effekt mehr nachgewiesen werden kann. Ebenso schwächen eingefügte SGG-Segmente ebenfalls die Reaktivität ab. Dies könnte ein wichtiger Faktor bei der Planung von Peptid- oder Proteintemplat-medierte Ligrationsreaktionen sein. Dennoch konnte durch die Einführung von Abstandshalter-Gruppen zwischen den funktionellen Gruppen und den Templat bindenden Einheiten der Trend zum Erhalt der Reaktivität in Anwesenheit eines Templats beobachtet werden. Zudem konnte festgestellt werden, dass das Ausmaß an sich ergebenden Überhängen der Abstandshalter keine entscheidende Auswirkungen auf die Reaktivität im vorgestellten Reaktionsdesign hat. Mit diesem Ergebnissen kann das Ausbleiben einer Templat-gesteuerten fNCL in Abschnitt 4.5.1 erklärt werden. Damit im Antikörper ein Abstand der beiden Bindungsstellen von 16.6 \AA erreicht werden kann, müssten der Winkel zwischen den „Ärmchen“ 12° betragen. Allerdings ist der Winkel zwischen den „Ärmchen“ bei Antikörpern in einem Bereich von 45° - 180° .²⁷⁸

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

5.1 Zusammenfassung

10% des Proteoms von Eukaryonten bestehen aus Coiled-coil-Domänen.²⁷⁹ Als Transkriptionsfaktoren binden sie DNA.²⁸⁰⁻²⁸³ Sie sind molekulare Abstandshalter und erlauben die definierte Separierung anderer funktioneller Domänen.²⁸⁴⁻²⁸⁸ Coiled-coil-Proteine sind essenziell für die korrekte Aufteilung der Chromosomen während der Zellteilung.²⁸⁹⁻²⁹³ Für den Transport von Ladungen sind sie in Motorproteinkomplexen wie Dynein oder Kinesin unabkömmlich.²⁹⁴⁻³⁰² Die biochemische Forschung nutzt Coiled-Coil-Domänen als sehr gut erforschte und verstandene Werkzeuge. In dieser Arbeit untersucht, ob und wie die Bildung von ternären coiled coil-Komplexen genutzt werden kann, um Verknüpfungsreaktionen zu steuern. Fernziel war es hierbei, die Entwicklung einer Methode vorzubereiten, durch die coiled coil-Peptide nachgewiesen und gefärbt werden können. Zwei reaktive Peptide wurden so konzipiert, dass diese mit dem Protein of Interest (POI) einen coiled coil-Komplex bilden. Dies führt zu einer erhöhten effektiven Konzentration, durch die eine Verknüpfungsreaktion zwischen den gebundenen Peptiden ermöglicht wird. Dieses Phänomen wird auch als Templat-Effekt bezeichnet. Die chemische Reaktion sollte zur Verstärkung eines Fluoreszenzsignals führen. Als Verknüpfungsreaktionen wurden in dieser Arbeit die Staudinger-Ligation und die native chemische Peptidverknüpfung (NCL) angewendet.

5.1.1 Fluorogene Staudinger-Ligation

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung einer fluorogenen Templat-gesteuerten Staudinger-Ligation ein Modellsystem, welches Bindungsmotive der von Hodges eingeführten K3- und E3-Peptide anwendet, entwickelt. Dabei war das E3-Peptid das Templatmolekül. Das C-terminal modifizierte K3-Azido-Peptidfragment konnte gut mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese dargestellt werden. Die Synthese des *ortho*-Phosphin-Benzoesäureesters K3-Peptidfragment wurde ausführlicher gesenkt.

Die Kupplung des *ortho*-Phosphin-Benzoesäureesters **93** konnte so optimiert werden, dass die Bildung eines Oxidationsprodukts **99(O)** weitgehend unterbunden wurde. Als nutzbringend erwies sich die Einführung der BH₃-Schutzgruppe am *ortho*-Phosphin-Benzoesäureester-Molekül **93**.

Die Aufreinigung des erhaltenen Zielpeptids stellte sich als schwierig heraus. Nur aufwendiges Entgasen nach der „Freeze-Pump-Thaw“-Methode erlaubte die Aufreinigung von **99** unter geringerer Bildung von **99(O)**.

In den ersten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Anwesenheit eines Peptid-Templats die Reaktionsgeschwindigkeit der Staudinger-Ligation beschleunigt.

Erste synthetische Arbeiten zur Durchführung einer fluorogenen Templat-gesteuerten Staudinger-Ligation wurden begonnen, konnten allerdings nicht erfolgreich beendet werden. Die Synthese des Zielpeptids **101** gelang nicht. Aus diesem Grund konzentrierte sich die Arbeit überwiegend auf die NCL als eine Modellreaktion für eine fluorogene Peptidverknüpfung.

5.1.2 Fluorogene native chemische Peptidverknüpfung

5.1.2.1 Einführung der Nativen chemischen Peptidverknüpfung (NCL) als Modellsystem für eine fluorogene Peptidverknüpfung

Die Vorexperimente zur NCL wurden analog zur Staudinger-Ligation im Konzentrationsbereich von 5 mM bis 50 μ M durchgeführt. Durch die Zugabe eines Templatmoleküls bei einer Peptidkonzentration von 50 μ M konnte die NCL im K3/E3-Modellsystem effektiv beschleunigt werden. Bei Peptidkonzentrationen von 50 μ M mit 50 mol% Templat konnten ähnliche Ausbeuten wie bei Peptidkonzentrationen von 5 mM ohne Templat erreicht werden.

Um die NCL als fluorogene Reaktion zu gestalten, wurde das Fluorophor in der Nähe des Thioesters platziert und die Thiolfuchtgruppe in der NCL als Fluoreszenzlöcher gestaltet (Abbildung 71). Beim Thioesteraustausch verlässt das Thiol des Thioesters das Fluoreszenz-markierte Molekül. Als Fluoreszenzlöcher wurde Dispers-Rot mit Hilfe von Mercaptopropionsäure modifiziert. Um den benötigten Thioester herzustellen, wurde die Methode der selbstreinigenden Peptidthioestersynthese adaptiert. Diese Methode schafft die Freiheit ein beliebiges Thiol in ein Peptid als C-terminalen α -Thioester einzuführen, um zusätzlich im selben Schritt die Abbruchsequenzen des Zielpeptids vom polymeren Träger zu entfernen. Diese konnten einfach vom Harz gewaschen werden.

Während dieser Synthese gab es einen kritischen Schritt. Durch die Deblockierung des α -Amins vom C-terminalen Lysin (zuvor Alloc-geschützt) kam es während der Acetylierung mit 5/6-Carboxyfluorescein zu einer intramolekularen ε -Lactam-Bildung. Das verhinderte vorerst die effektive Synthese des fluorogenen Thioesters. Durch eine Anpassung des Acetylierungsprotokolls wurde eine Tandem-Entschützungs-Kupplungsstrategie entwickelt. Die Alloc-Entschützung des ε -Amins und die Acetylierung des nun freien ε -Amins wurden in einem Reaktionsschritt mit nur noch einer Reaktionslösung durchgeführt. Die Bildung des ε -Lactams konnte damit unterbunden werden und der fluorogene Thioester wurde erfolgreich dargestellt. Die erfolgreiche Synthese dieses Thioesters **109** erlaubte die Untersuchung des Modellsystems zur fluorogenen nativen Peptidverknüpfung. Ähnlich wie bei dem Modell zur nicht fluorogenen NCL konnte die Anwesenheit des Templatmoleküls eine Reaktionsbeschleunigung hervorrufen. Jetzt konnten deutlich geringere Peptidkonzentrationen eingesetzt werden. Während die fluorogene native chemische Peptidknüpfung bei 50 μ M noch mit Hilfe der HPLC-MS überwacht werden konnte, war dies bei einer Peptidkonzentration von 5 μ M nicht mehr möglich. Hier war die Detektion nur noch mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie möglich.

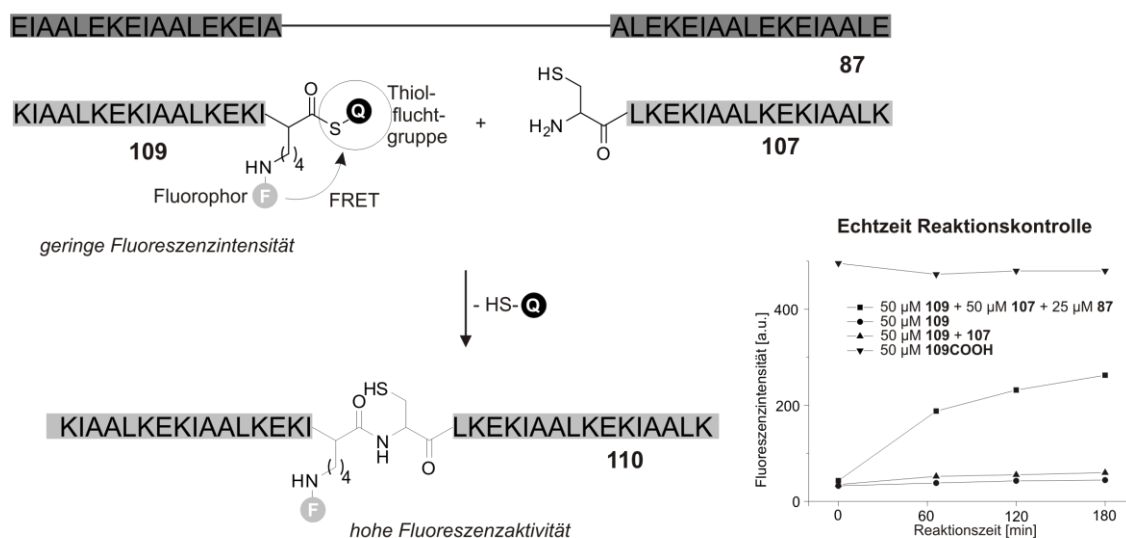


Abbildung 71: Die Gestaltung der Thiolfuchtgruppe als Fluoreszenzlöcher und die Platzierung eines Fluorophors in der Nähe der Thioestergruppe erlaubt die Durchführung der NCL als eine fluorogene Reaktion. Das erlaubt eine Echtzeitkontrolle einer solchen fluorogenen NCL.

Die Fluoreszenzspektroskopie hatte gegenüber der Flüssigchromatographie viele Vorteile. Es entfiel die Aufwendige Aliquotierung der einzelnen Proben zu unterschiedlichen Reaktionszeiten. Die Reaktion musste für die UPLC-MS zusätzlich

zum Messzeitpunkt durch die Zugabe von HCl unterbrochen werden. Durch die Aliquotierung verkleinert sich das Volumen der Ursprungsreaktionslösung zu jedem Messzeitpunkt und eine Reaktion muss so geplant werden, dass zum Zeitpunkt der Entnahme des letzten Aliquots immer noch genügend Reaktionslösungsvolumen vorhanden ist. Das bedeutete eine äußerst unflexible Reaktionskontrolle. All diese Punkte fallen bei der Durchführung der fluorogenen NCL im Fluoreszenzspektrometer weg. Die Reaktion konnte in Echtzeit ohne Zeitverzögerung überwacht werden, ohne dass der Reaktionslösung Aliquote entnommen werden mussten (Abbildung 71). Zusätzlich entfiel eine Probenvorbereitung und eine Unterbrechung der stattfindenden chemischen Reaktion für eine UPLC-MS Messung durch die Fluoreszenzspektroskopie völlig. Die Nachweisgrenze wurde durch die Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie deutlich herabgesetzt und es konnten Reaktionen bei Peptidkonzentrationen im sub-mikromolaren Bereich untersucht werden. Mit der Fluoreszenzspektroskopie konnten, im Gegensatz zu UPLC-MS als Nachweismethode, mehrere unterschiedliche Reaktionen parallel untersucht werden.

5.1.2.2 Die Verwendung von doppelsträngiger DNA als Templat in einer Templat-gesteuerten nativen chemischen Peptidverknüpfung

Inspiziert vom Leucin-Reißverschluss in der Natur wurde in diesem Abschnitt keine peptidische Spezies als Templatmolekül, sondern doppelsträngige DNA verwendet. Als bindende Peptidfragmente fanden die Jun- und Fos-Peptidfragmente Anwendung. Durch die Anwesenheit der AP-1-Sequenz (doppelsträngige DNA) könnten diese beiden Peptidfragmente schneller Heterodimere bilden. Beide Peptidfragmente besitzen an ihren N-Terminus eine basische Region, in welcher vorwiegend Aminosäuren wie Arginin oder Lysin vorkommen. Dieser Peptidabschnitt ist für die Bindung an der doppelsträngigen DNA verantwortlich. Die Bildung von Heterodimeren findet im Bereich des am C-Terminus statt. Hier findet man im Jun- und Fos-Peptid die Coiled-coil-Domäne. Aus diesem Grund wurden dort die reaktiven Gruppen für eine fluorogene native chemische Peptidverknüpfung angebracht. Die C-terminale Modifikation mit Cystein fand über die Einführung eines C-terminalen Lysins und die Acetylierung dessen ϵ -Amins mit S-MeBzl geschützten Cystein statt. Um den C-Terminus der Jun- und Fos-Peptide mit fluorogenen Gruppen auszustatten, wurden zwei Ansätze verfolgt.

Der erste Ansatz stellte die die konsequente, schrittweise Modifikation des Peptids am polymeren Träger dar. Hier wurde ein C-terminal lokalisiertes Lysin als acetylierbarer Modifikator zur Einführung eines 5/6-Carboxyfluoresceins verwendet. Die Carboxylseitenkette einer benachbarten Asparaginsäure war eine Vorstufe des Thioesters. Der zweite Ansatz stellte die einmalige Modifikation des C-Terminus der Jun- und Fos-Peptide mit einem bereits zuvor synthetisierten Baustein, welcher die gewünschten fluorogenen Eigenschaften mitbringt, dar

Durch die erste Strategie konnte kein reaktionsfähiger fluorogener Thioester isoliert werden. Die hohe Anzahl an Reaktionsschritten auf dem festen Träger führte zu einem Mix an Reaktionsprodukten, da selbst an der festen Phase kein Reaktionsschritt vollkommen quantitativ ablief. Die so erhaltene ungereinigte Abspaltlösung konnte nicht aufgetrennt werden, um den gewünschten Thioester zu isolieren. Um das synthetisierte fluorogene Thioestermolekül mit der C-terminalen Coiled-coil-Domäne zu verknüpfen, wurde auf die „Click“-Reaktion zurückgegriffen. Mit Hilfe dieser Methode konnte sowohl das Jun- als auch Fos-Peptide als fluorogener Thioester synthetisiert werden.

Anschließend konnten die ersten AP-1 Templat-gesteuerten fluorogenen nativen chemischen Peptidverknüpfungsreaktionen durchgeführt werden. Es konnte bei der Reaktion mit **JunCTTE** ein Templat-Effekt nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzintensität des hydrolysierten **JunCTTE** wurde hier als Wert für die maximale Ausbeute angenommen („100%“-Wert). Wurden bei einer Peptidkonzentration von 0.5 μ M zum Thioester **JunCTTE** die Cysteinylpeptide **FosCTCys** und **JunCTCys** gegeben, wurde ein Fluoreszenzanstieg entsprechend einer Ausbeute von 37% und 16% beobachtet. Wird die doppelsträngige AP-1 DNA zum **JunCTTE** und **JunCTCys** gegeben, konnte eine Ausbeute von 28% erreicht werden. Analog bei **JunCTTE** und **FosCTCys** wurde eine Ausbeute von 85% erreicht. Das war ein Hinweis auf einen durch die Anwesenheit von AP-1 hervorgerufenen Beschleunigung der fluorogenen NCL zwischen den Jun- und Fos-Peptiden.

Das immer wieder auftauchende Problem der permanent abfallenden Fluoreszenz des hydrolysierten **JunCTTE** deutete auf eine Homodimerisierung von **JunCTTE** hin. Um eine stabile Fluoreszenzintensität für den hydrolysierten **JunCTTE** zu erhalten, wurden Detergentien wie DDM, Tween 20, Triton X100 und NP40 und das bindungsblockierende Protein BSA verwendet. Zwar führte die Zugabe der

Detergentien zu keiner konstanten Fluoreszenz des hydrolysierten **JunCTTE**, jedoch konnte eine Homodimerisierung als wahrscheinlichster Grund für diesen Effekt herausgestellt werden, da die Zugabe von stärker bindenden Fos die gesunkene Fluoreszenzintensität teilweise wieder herstellen konnte. Auch führte die Zugabe von 6 M GnHCl und der Verdau durch Trypsin von **JunCTTE** zu keinem Absinken der Fluoreszenzintensität mehr.

5.1.2.3 Antikörper als Templat für die NCL

In diesem Abschnitt wurde ein Antikörper als Templat, welcher von Peptidfragmenten gebunden werden soll, um ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen, genutzt. Um ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen, wurde auf das Prinzip der hier entwickelten fluorogenen NCL zurückgegriffen. Zur Untersuchung der fluorogenen nativen chemischen Peptidverknüpfung war der Antikörper ein spannendes Bindungsziel. Der Antikörper besitzt zwei Bindungsstellen und erfüllt damit das wichtigste Kriterium eines Templatmoleküls.

Zur Vermittlung der fNCL wurde der Anti-FLAG-Antikörper, welcher das Epitop DYKDDDDK trägt, verwendet. In den nicht fluorogenen Testreaktionen wurde festgestellt, dass die Zugabe des Thioester-Epitop-Konjugats und Cysteinyl-Epitop-Konjugat zu einer Erniedrigung der Ligationsausbeute führte. Aufgrund dieser Beobachtung wurde angenommen, dass der Antikörper die entsprechend modifizierten Epitope gebunden hatte, aber gleichzeitig die Binder räumlich trennte. Die räumliche Distanz verhinderte die Annäherung der reaktiven Gruppen. Aufgrund dieser Annahme wurde das Reaktionsdesign für eine fluorogene NCL an dieser Stelle modifiziert.

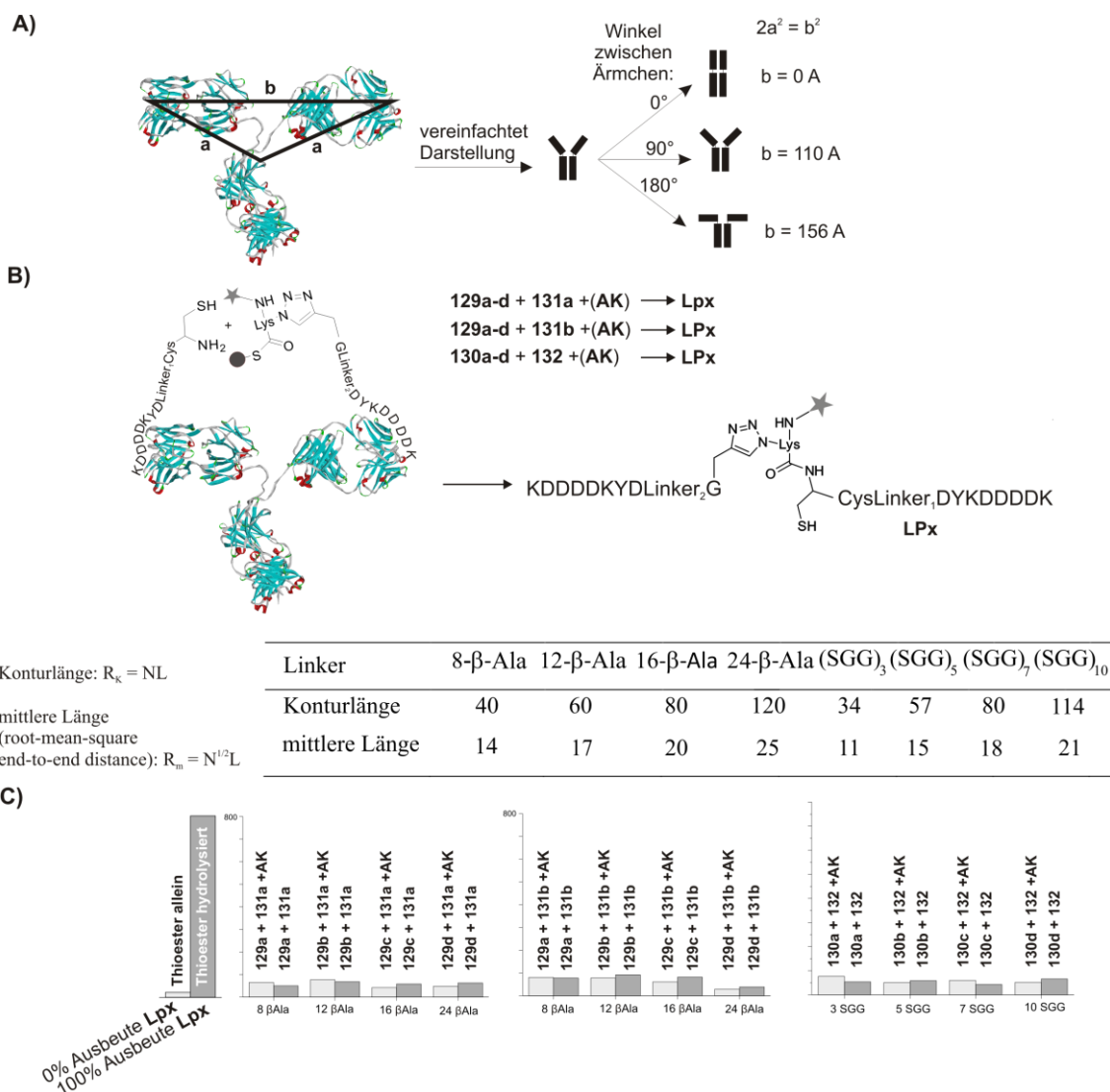


Abbildung 72: **A)** Durch eine Abmessung der Röntgenkristallstruktur des Anti-FLAG-Antikörpers konnte ein minimaler Abstand der Antikörperarme von 0 Å (bei 0°), ein mittlerer Abstand der Antikörperarme von 110 Å (bei 90°) und ein maximaler der Antikörperarme von 156 Å (bei 180°) festgelegt werden. **B)** Durch verschiedene Kombinationen der reaktiven Peptide **129a-c**, **130a-c**, **131a**, **131b** und **132** können unterschiedliche Distanzen überbrückt werden. Mithilfe der β-Ala-Peptide können Distanzen von min. 80 Å bis max. 180 Å (Konturlänge) bzw. Distanzen von 28 Å bis max. 42 Å (mittlere Länge) überwunden werden. Mithilfe der SGG-Peptide können Distanzen von min. 68 Å bis max. 148 Å (Konturlänge) bzw. Distanzen von 22 Å bis max. 32 Å (mittlere Länge) überwunden werden ($L(\beta\text{-Ala}) = 5 \text{ Å}$, $L(\text{S oder G}) = 3.81 \text{ Å}$; vgl. Tabelle in B)). **C)** Für die fluorometrisch vermessenen Reaktionskombinationen konnte durch die Zugabe des Anti-FLAG-Antikörpers keine vermehrte Bildung eines Reaktionsprodukts nachgewiesen werden.

Die reaktiven Gruppen und die Epitope wurden durch unterschiedlich lange peptidische Linker voneinander getrennt. Als Linker wurden Poly-β-Alanin und Serin-Glycin-Glycin-Segmente verwendet. Um die Epitope als fluorogene Thioester zu modifizieren, wurde auf die Strategie aus Abschnitt 4.4 zurückgegriffen. Das Thioestermolekül wurde N-Terminal an das Linker-Epitop-Konjugat mit Hilfe der Click-Reaktion angebracht. Da die Click-Reaktion zum Abschluss der Festphasenpeptidsynthese angebracht wurde, agierte **123** zusätzlich als eine Art hydrophober Anker, welcher die Isolation der

Zielpeptide deutlich vereinfachte. Neben den Thioestern wurden die Cysteinylopeptide mit Poly- β -Alanin und SGG-Segmenten modifiziert. Durch die Kombination der Cysteinylopeptide und Thioesterpeptide konnten mit den Poly- β -Alaninlinkern und den Poly-SGG-Linkern Konturlängen von 80 Å-180 Å bzw. 68 Å-148 Å überwunden werden. Wurden die mittleren Längen betrachtet, waren es 28 Å - 42 Å für die Poly- β -Alaninlinker und 22 Å - 32 Å für die Poly-SGG-Linker (vgl. Tabelle in Abbildung 72). Es wurde beobachtet, dass bei der fluorogenen NCL in Anwesenheit des Anti-FLAG-Antikörpers mit zwölf Reaktionspermutativen kein Anstieg des Fluoreszenzsignals nachgewiesen werden konnte. Mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisation konnte der qualitative Nachweis einer Bindung der Click-modifizierten Peptide erbracht werden. Weiterhin wurde in höheren Peptidkonzentrationen durch UPLC-MS gezeigt, dass die N-terminalen Thioesterepitope in der Lage ist mit den Cysteinylopeptiden zu reagieren, um das jeweils gewünschte Ligationsprodukt zu bilden. Es wurde angenommen, dass der Abstand der Bindungsarme im FLAG-Antikörper doch zu groß war, um zwei gebundene Peptide soweit anzunähern, sodass eine chemische Reaktion ablaufen kann. Der Versuch, den Abstand zwischen beiden Bindungsstellen im Anti-FLAG-Antikörper mit Poly- β -Alanin- und SGG-Segment-Linkern zu kompensieren, schlug somit fehl (Abbildung 72 C).

5.1.2.4 Abstandsscreening

Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.5 wurden als Ausgangspunkt für ein Abstandsscreening herangezogen. Dabei wurde die Modellreaktion aus Abschnitt 4.2.1 verwendet. Ein E6-Templat wurde derart modifiziert, dass zwischen zwei E3-Peptiden ein Linker eingefügt wurde. Der Linker bestand aus SGG-Segmenten. Es wurde untersucht, inwiefern die Veränderung der Länge dieser Linker im Templatmolekül die Ausbeute der fluorogenen nativen chemischen Peptidverknüpfung von zwei K3-Peptidfragmenten beeinflusst. Zusätzlich wurden die reaktiven Peptidfragmente durch die Einführung von SGG-Segmenten zwischen dem K3-Abschnitt und der reaktiven Gruppe modifiziert. So konnte ein einfaches Modellsystem zur Untersuchung der abstandsabhängigen Ausbeute in einer fNCL vorgestellt werden. Die Ausbeuten konnten schnell und in Echtzeit mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden.

Es wurde beobachtet, dass die Ausbeute der NCL von den Abständen der Bindungsstellen im Templat abhängt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein größerer Abstand der Bindungsstellen im Templat durch eine Erhöhung der Anzahl der

SGG-Segmente in den bindenden K3-Peptiden zu höheren erhöhten Ausbeuten führte. Ähnlich wie bei der fNCL mit dem Anti-FLAG-Antikörper fand hier keine Reaktion zwischen zu weit entfernten reaktiven Gruppen statt. Allerdings gelang es hier unter kontrollierten Bedingungen durch die Verlängerung des Abstands zwischen den reaktiven Gruppen und dem Peptidfragment, wieder eine Reaktion stattfinden zu lassen.

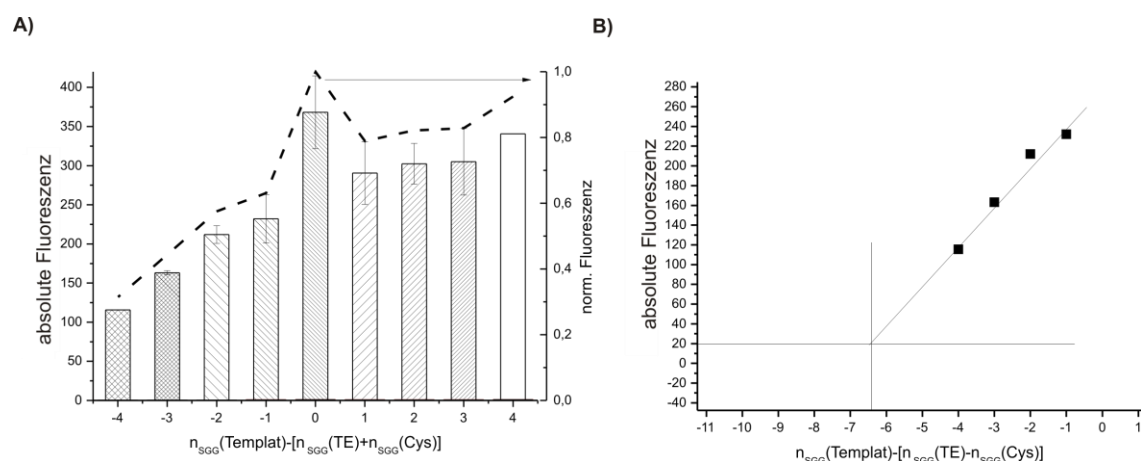


Abbildung 73: A) Auftragung aller zusammengefassten ΔSGG -Mittelwerte mit der entsprechend auf den Maximalwert der Fluoreszenz normierte Fluoreszenz. B) Betrachtung der ΔSGG -Werte von -4 bis -1 und deren lineare Regression (gepunktete Linie).

Um einen Abstand zwischen zwei Bindungsstellen zu bestimmen, ab dem keine Reaktion mehr zwischen zwei bindenden reaktiven Peptiden stattfindet, wurde die Hilfsgröße ΔSGG eingeführt. Negative Werte von ΔSGG zeigen an, dass die Anzahl der SGG-Segmente in den reaktiven Peptiden nicht ausreichend war, um den ebenfalls durch SGG-Segmente im Templat erzeugten Abstand der Bindungsstellen zu überwinden (Abbildung 73 A). Die Ermittlung der Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten der ΔSGG -Werte erlaubte eine Berechnung einer Regressionsgerade über die Werte von $\Delta SGG = -1$ bis $\Delta SGG = -4$. Die Fluoreszenzintensität, welche der Hintergrundhydrolyse entsprach, würde die Regression bei $\Delta SGG = -6.4$ schneiden (Abbildung 73 B). Daraus wurde geschlossen, dass bei einem Abstand von 16.6 Å zwischen den reaktiven Gruppen kein Templat-Effekt mehr zu beobachten ist. Dennoch führte eine Verlängerung der SGG-Segmente zwischen den reaktiven Gruppen und den Bindungsstellen der reaktiven Peptide zu einer Kompensation dieser Distanz. Ob diese Kompensation auch bei größeren Distanzen zwischen den Bindungsstellen am Templatmolekül möglich ist, oder ob sogar eine Grenze für die Kompensation existiert, sollte an diesen Modellsystem überprüft werden. Die Experimente aus Abschnitt 4.5 deuten allerdings auf solch eine Grenze hin.

5.2 Ausblick

Diese Arbeit stellt wichtige Erkenntnisse für die Anwendung einer fluorogenen nativen chemischen Peptidverknüpfung zur Verfügung. Es wurde eine neue fluorogene Peptidverknüpfung zwischen zwei Peptidfragmenten vorgestellt. Durch die Gestaltung der Peptidfragmente, konnte die Reaktion so durchgeführt werden, dass sie als Nachweisreaktion für ein Element, welches die Peptidfragmente bindet, genutzt werden kann. In dieser Arbeit konnte das System noch nicht an einem biologischen POI angewendet werden. Hierzu würde sich u.a. das bereits bearbeitete Beispiel in Abbildung 14 anbieten. Die Vorarbeiten im K3/E3-Modellsystem und die hier etablierte selbstreinigende Thioestersynthese mit Tandem-Entschützungs-Kupplungs-Strategie der Fluoreszenzmarkierung erlaubt einen schnellen Transfer auf andere Bindungssituationen und somit andere Peptidthioester-Sequenzen. Die vorgestellte Thioestersynthese bietet die Möglichkeit beliebige Fluoreszenzfarbstoffe und Thiol-modifizierte Fluoreszenzlöcher zu verwenden. So ist eine multiplexe fluorogene native chemische Peptidverknüpfung denkbar. Durch Algorithmen ist es möglich unterschiedliche Coil-Peptid-Template zu erzeugen. Durch das Design von komplementären reaktiven Peptidfragmenten, könnte ein multiplexer Ansatz leicht untersucht werden.

Weiterhin konnte eine äußerst flexible Synthese-Route für N-terminale fluorogene Thioester entwickelt werden. Diese Methode erlaubt die bequeme Erweiterung N-terminaler Alkin-modifizierter Peptide durch einen Baustein, welcher die fluorogene Eigenschaften bereits trägt. Da der Baustein im Vorfeld synthetisiert wird, ist hier ebenfalls ein multiplexer Ansatz denkbar. Der α -Stickstoff und die Carboxylgruppe von Azidolysin können mit einem beliebigen Fluorophor und Fluoreszenzlöcher ausgestattet werden.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Messgeräte und Hilfsmittel

6.1.1 Chemikalien

Die für die Festphasenpeptidsynthese verwendeten Harze wurden von der Firma NOVOBIOCHEM (NOVASYN-TGR-Harz) und RAPP POLYMERS (Polystyrol-S-NH₂-Harz) bezogen. Fmoc-geschützte Aminosäuren wurden von BIOSOLVE bezogen. Boc-geschützte Aminosäuren wurden von der Firma NEOMPS erworben. Die verwendeten Kupplungsreagenzien wurden von IRIS BIOTECH und NOVABIOCHEM bezogen. Das DMF für die Festphasenpeptidsynthese stammte von BIOSOLVE. Die weiteren für die Festphasenpeptidsynthese verwendeten Chemikalien (Essigsäureanhydrid, Piperidin, NMM, DIPEA) wurden von ACROS ORGANICS bezogen. Weiterhin wurden Chemikalien der Firmen ACROS, ALDRICH und FLUKA verwendet.

6.1.2 Festphasenpeptidsynthese

Die manuelle Festphasenpeptidsynthese wurde je nach Ansatzgröße in 2 ml bzw. 5 ml PE-Spritzenreaktoren mit Teflonfritten (Porengröße: 50 µm) der Firmen MULTISYNTECH/WITTEN und BRAUN durchgeführt. Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde in 5-10 µmol Maßstab an einem MULTIPEP RS-Peptidsyntheseautomaten in 2 ml Spritzenreaktoren der Firma INTAVIS AG durchgeführt.

6.1.3 MALDI/TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI/TOF-Massenspektren wurden mit zwei Geräten gemessen. Einmal wurde mit der VOYAGER-DE PRO BIOSPECTROMETRY WORKSTATION der Firma PERCEPTIVE BIOSYSTEMS gemessen. Zur Ionisierung wurde ein Stickstoff-UV-Laser der Wellenlänge = 337 nm verwendet (Beschleunigungsspannung: 20 kV, Grid: 94 %, Guide Wire: 0.05, Delay Time: 100 ns). Das zweite Gerät war ein BRUKER REFLEX III mit einem Stickstoff-Laser der Wellenlänge 337 nm

Beschleunigungsspannung: 20 kV, Delay Time: 45 ns). Als Matrix wurden eine Lösung von $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Wasser und eine gesättigte Lösung von Sinapinsäure in MeCN/H₂O/TFA (49.9:50:0.1) verwendet.

6.1.4 Analytische HPLC:

Analytischen HPLC-Analysen wurden mit einer ELITE LACHROM-Anlage der Firma MERCK-HITACHI durchgeführt. Die Detektion der Signale erfolgte hierbei mit einem Diodenarray-UV-Vis-Detektor bei einer Wellenlänge von 220 nm. Zur Trennung wurde eine auf 55 °C temperierte POLARIS RP-C18 Säule (5 μ 250/4, Porengröße: 220 Å) der Firma VARIAN bei einer Flussrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ verwendet. Als mobile Phasen wurden folgende Gemische eingesetzt: A1 (98.9 % Wasser, 1% Acetonitril, 0.1% TFA) und B1 (98.9% Acetonitril, 1% Wasser, 0.1% TFA).

6.1.5 Analytische HPLC-MS

Analytischen HPLC-MS-Analysen wurden auf einem Gerät der Firma AGILENT der SERIE 1100 durchgeführt. Zur Detektion der Molekülmassen wurde ein SL-Quadrupol Massenspektrometer verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mit einem UV-Vis-Detektor bei einer Wellenlänge von 210 nm. Zur Trennung wurde eine auf 55 °C temperierte POLARIS RP-C18 Säule (3 μ , 125/2, Porengröße: 220 Å) der Firma VARIAN bei einer Flussrate von $0.3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ verwendet. Als mobile Phasen wurden folgende Gemische eingesetzt: A2 (98.9% Wasser, 1% Acetonitril, 0.1% Ameisensäure) und B2 (98.9% Acetonitril, 1% Wasser, 0.1% Ameisensäure).

6.1.6 Analytische UPLC-MS

Analytischen UPLC-Analysen wurden auf einem AQUITY ULTRA PERFORMANCE LC Gerät der Firma WATERS gemessen. Die Detektion der Signale erfolgte mit einem UV-Vis-Detektor bei einer Wellenlänge von 210 nm. Zur Detektion der Molekülmassen wurde ein SL-Quadrupol Massenspektrometer verwendet. Zur Trennung wurde eine auf 50 °C temperierte RP-C18 Säule (1.7 μ , 2.1×50 , Porengröße: 130 Å) der Firma WATERS bei einer Flussrate von $0.6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ verwendet. Als mobile Phasen wurden folgende Gemische eingesetzt: A1 (98.9% Wasser, 1% Acetonitril, 0.1% TFA) und B1 (98.9% Acetonitril, 1% Wasser, 0.1% TFA), A2 (98.9% Wasser, 1% Acetonitril, 0.1% Ameisensäure) und B2 (98.9% Acetonitril, 1% Wasser, 0.1% Ameisensäure).

6.1.7 Präparative und semipräparative HPLC

Die präparativen und semipräparativen HPLC-Trennungen wurden auf einem Gerät der Firma AGILENT der SERIE 1100 durchgeführt. Die Detektion der Signale erfolgte mit einem UV-Vis-Detektor bei einer Wellenlänge von 220 nm. Zur Trennung wurde eine POLARIS RP-C18 Säule (5 μ , 220 \times 100, Porengröße: 220 Å) der Firma VARIAN bei einer Flussrate von 6 ml \cdot ml⁻¹ und eine GRAVITY RP-C18 Säule (5 μ , 25 \times 21, Porengröße: 220 Å) bei einer Flussrate von 15 ml \cdot ml⁻¹ verwendet. Als mobile Phasen wurden folgende Gemische eingesetzt: A1 (98.9% Wasser, 1% Acetonitril, 0.1% TFA) und B1 (98.9% Acetonitril, 1% Wasser, 0.1% TFA).

6.1.8 Photometer

Die UV-Vis-Messungen wurden an einem SMARTSPEC PLUS SPECTROPHOTOMETER der Firma BIORAD durchgeführt. Vor jedem Messzyklus wurde die Absorption des Lösungsmittel als Hintergrund bestimmt. Dabei erfolgten die Messungen in 1 ml bzw. 0.1 ml Halbmikro-Quarzküvetten der Firma HELLMMA.

6.1.9 UV-spektroskopische Bestimmung der Kupplungsausbeuten bzw. des Beladungsgrads (Fmoc-Monitoring)

Für die Bestimmung der Beladung eines Harzes wurden ca. 1 mg des entsprechenden Harzes eingewogen, in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß mit 1 ml einer Lösung aus Piperidin/DMF (1:4) versetzt und fünf Minuten lang geschüttelt. Die Konzentration des gebildeten Piperidin-Fulvenaddukts konnte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gl. 7.1) bei einer Wellenlänge von 300 nm bestimmt werden. Dabei ist der Extinktionskoeffizient bei 300 nm gleich 7800 l \cdot M⁻¹ \cdot cm⁻¹.

6.1.10 Konzentrationsbestimmung der Peptid-Stammlösungen

Enthielt die Peptidsequenz ein Tyrosin, konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280\text{nm}} = 1490 \text{ l} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ die Konzentration des Peptids in Lösung berechnet werden. Waren keine guten Chromophore in der Peptidsequenz enthalten, konnte die Absorption

bei 214 nm gemessen werden. Hierzu musste jedoch der sequenzspezifische Extinktionskoeffizient $\epsilon_{214\text{nm}}$ berechnet werden. Jede Amidbindung besitzt dabei einen Wert von $\epsilon_{214\text{nm}}$ gleich $923 \text{ l} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Die Extinktionskoeffizienten der Aminosäureseitenketten können Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5: Extinktionskoeffizienten der Aminosäureseitenketten der verwendeten Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 214 nm.

Aminosäure	$\epsilon_{214\text{nm}}$	Aminosäure	$\epsilon_{214\text{nm}}$
Alanin	32	Leucin	45
Arginin	102	Lysin	41
Asparagin	136	Methionin	980
Asparaginsäure	58	Phenylalanin	5200
Cystein	225	Prolin	30
Glutamin	142	Serin	34
Glutaminsäure	78	Threonin	41
Glycin	21	Tryptophan	29050
Histidin	5125	Thyrosin	5375
Isoleucin	45	Valin	43

6.1.11 NMR-Spektroskopie

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit Spektrometern des Typs AVANCE II 300, AVANCE II 400, AVANCE II 500 und AVANCE 600 der Firma Bruker gemessen. Als interner Standard für die ^1H -NMR-Spektren diente das Restprotonensignal des deuterierten Lösungsmittels (CDCl_3 : $\delta = 7.26$; CD_3OD : $\delta = 4.84$; $\text{d}_6\text{-DMSO}$: $\delta = 2.50$, D_2O : $\delta = 4.79$). Zur Kennzeichnung der Multiplizität der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), t(dd) (Pseudotriplett), m (Multiplett), mc (zentriertes Multiplett), br (verbreitertes Signal). Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden ^1H -breitbandentkoppelt gemessen und mit dem Signal des deuterierten Lösungsmittels (CDCl_3 : $\delta = 77.16$; CD_3OD : $\delta = 49.05$; $\text{d}_6\text{-DMSO}$: $\delta = 39.43$) referenziert. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ -Skala (ppm – parts per million) angegeben.

6.1.12 Dünnschichtchromatographie

Für dünnenschichtchromatographische Analysen kamen mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminium-platten der Firma Merck (Typ 60-F254, Schichtdicke 0.2 mm) zum Einsatz. Angegeben sind R_F -Werte (Laufhöhe, relativ zur Laufmittelfront). Neben der Detektion der Fluoreszenzauslöschung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm wurden die Chromatogramme mit folgenden Tauch-Reagenzien angefärbt: ethanolische Schwefelsäure (5 mL konzentrierte Schwefelsäure, 95 mL Ethanol), Seebach-Reagenz (1.0 g Cer(IV)-sulfat-Tetrahydrat, 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 94 mL Wasser, 6 mL konzentrierte Schwefelsäure).

6.1.13 Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Trennungen wurden bei erhöhtem Druck (Flash-Chromatographie) an Kieselgel 60 der Firma Acros (Korngröße: 0.035 – 0.070 mm) durchgeführt.

6.1.14 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe eines Varian Cary Eclipse Spektrometer aufgenommen. Als Anregungswellenlänge für die 5/6-Carboxyfluoresceingruppe wurde 495 nm gewählt. Der Schlitz für das eingestrahlte Licht dieser Wellenlänge wurde mit 5 nm gewählt. Die fluorogenen Reaktionen wurden überwacht, indem das abgestrahlte Licht als Fluoreszenzsignal bei 525 nm aufgezeichnet wurde. Der Schlitz für das emittierte Licht wurde ebenfalls auf 5 nm eingestellt. Der Küvettenhalter wurde auf eine Temperatur von 22°C temperiert.

6.2 Manuelle Peptidsynthese

6.2.1 Manuelle Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie

- *Beladung:* 40 mg eines TGR-Harzes (Beladung: 0.25 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}$) wurden in einen 3 ml Spritzenreaktor eingewogen und eine Stunde lang in etwa 1 ml DMF quellen gelassen. Um die erste Fmoc geschützte Aminosäure (Fmoc-AA-OH) auf das Harz zu kuppeln, wurde das Harz dreimal mit je 4 Äq Fmoc-AA-OH (0.2-0.3 M), 3.6 Äq HCTU, 4 Äq HOBt und 8 Äq NMM in DMF für 30 min behandelt. Das Harz wurde fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH_2Cl_2 und fünfmal mit DMF gewaschen. Anschließend wurden für 5 Minuten 1 ml einer Lösung aus Pyridin/ Ac_2O (9:1) zu

dem Harz gegeben. Das Harz wurde nun fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit DMF gewaschen.

- *Fmoc-Protokolle zum Aufbau der Cysteinylpeptide:* Die Fmoc-Schutzgruppe wurde zweimal mit je 1 ml einer Lösung von Piperidin/DMF (1:4) behandelt. Die Kupplungsausbeuten konnten nach Gl. 7.1 mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens bestimmt werden. Nach der Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit DMF gewaschen. Das Harz wurde nun 30 Minuten mit einer Lösung von 4 Äq Fmoc-AA-OH (0.2-0.3 M), 3.6 Äq HCTU, 4 Äq HOBt und 8 Äq NMM behandelt und darauf fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit DMF gewaschen. Das Harz wurde anschließend 5 Minuten mit einer Lösung aus Pyridin/Ac₂O (9:1) behandelt und wieder fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit DMF gewaschen werden. Bei der Synthese von Peptiden nach der Fmoc-Strategie muss die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe vor der Freisetzung vom polymeren Träger entfernt werden.
- *Freisetzung vom polymeren Träger:* Vor der Abspaltung des Volllängenpeptids wurde das Harz fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH₂Cl₂, fünfmal mit DMF und zehnmal mit CH₂Cl₂ gewaschen. Zur Abspaltung wurde eine Abspatlösung von TFA/TIS/H₂O (96:2:2) hergestellt. Zu der Abspatlösung wurden noch 2 mg · ml⁻¹ H-Cys-OMe · HCl gegeben. Für eine Ansatzgröße von 10 µl wurden 1 ml Abspatlösung zu dem Harz gegeben. Das Harz wird 1.5 Stunden in der Abspatlösung geschüttelt. Enthält das Peptid Pbf-geschütztes Arginin, wurden 20% mehr Abspatlösung zum Harz gegeben. Es wurde dabei 2 h geschüttelt. Die Abspatlösung wurde in die 8 bis 10 fache Menge kalten Diethylether gegeben. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugieren bei 4300 U · min⁻¹ bei 4 °C abgetrennt.
- *Aufreinigung des Rohproduktes:* Das getrocknete Präzipitat wurde je nach Löslichkeit in der nötigen Menge Wasser bzw. einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser/TFA (59.9:40:0.1) aufgenommen und mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt.

6.2.1.1 Testabspaltung vom polymeren Träger

Es wurden ca. 1 mg am Hochvakuum getrocknetes Harz in ein 2 ml Sarstedtgefäß eingewogen und mit 100 µl Abspatlösung aus Abschnitt 6.2.1 versetzt und zwei

Stunden lang geschüttelt. Die Abspalllösung wurde in 850 μl kalten Ether gegeben und konnte als abzentrifugiertes Präzipitat mittels analytischer HPLC analysiert werden.

6.2.1.2 Fmoc-Testabspaltung

Es wurden ca. 1 mg am Hochvakuum getrocknetes Harz in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß eingewogen und mit 1 ml einer Lösung aus Piperidin/DMF (1:4) versetzt und fünf Minuten geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren wurde die Entschützungslösung abgenommen und die Stoffmenge des vorhandenen Peptids am Harz mit Hilfe der Methode aus Abschnitt 7.1 bestimmt.

6.2.2 Synthese von Peptidthioestern nach der Boc-Strategie

Beladung: 250 mg eines MBHA-Harzes (Beladung: $1.3 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) wurden in einem 3 ml Spritzenreaktor eingewogen und 30 min in ca. 1 ml DMF quellen gelassen. Anschließend wurde das Harz zweimal 10 min in 5 % DIPEA in DMF geschüttelt. Das Harz wurde fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH_2Cl_2 und wieder fünfmal mit DMF gewaschen. Um eine Beladung von ca. $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ zu erreichen wurden 4 Äq Fmoc-Glycin, 4 Äq PyBOP und 8 Äq NMM eine Stunde lang in 1.5 ml DMF zur Reaktion gebracht. Das Harz wurde fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH_2Cl_2 und fünfmal mit DMF gewaschen. Nun wurde das Harz einmal 10 min mit einer Lösung aus Pyridin/Essigsäureanhydrid (9:1) behandelt. Nach Abfiltrieren der Capping-Lösung wurde das Harz fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH_2Cl_2 , fünfmal mit DMF und zehnmal mit CH_2Cl_2 gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Der Beladungsgrad wurde mit Hilfe des Fmoc-Monitorings bestimmt. Beladungsgrad des MBHA-Harzes: $0.46 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$

Manuelle Synthese von Mercaptopropionsäureglycinamid-Thioestern: 18.18 mg (10 μmol) des MBHA-Harzes (Beladung: $0.46 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) wurden in einem 3 ml Spritzenreaktor eingewogen und 3 Stunden in ca. 2 ml DMF quellen gelassen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch die Behandlung des Harzes mit zweimal 2 min mit je 500 μl einer Lösung aus Piperidin/DMF (1:4). Das Harz wurde fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH_2Cl_2 und fünfmal mit DMF gewaschen. Die nun freien Aminogruppen wurden zweimal je eine Stunde mit je 10 Äq 3-Tritylmercaptopropionsäure, 10 Äq PyBOP und 12 Äq NMM zu Reaktion gebracht. Das Harz wurde fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH_2Cl_2 und fünfmal mit DMF gewaschen. Nach der Behandlung des Harzes mit 1 ml Pyridin/ Ac_2O (9:1) für eine

Minute, wurde das Harz fünfmal mit DMF und zehnmal mit CH_2Cl_2 gewaschen. Die Tritylgruppe wurde durch Schütteln mit einer Lösung von 1.5 ml 5 % TIS in TFA für 30 Minuten entfernt. Anschließend wurde das Harz zehnmal mit CH_2Cl_2 und fünfmal mit DMF gewaschen. Anschließend wurde eine Boc-geschützten Aminosäure (Boc-AA-OH) auf die freie Thiolgruppe gekuppelt. Hierzu wurden 4 Äq Boc-AA-OH, 3.6 Äq HCTU, 4 Äq HOBt und 8 Äq NMM in 500 μl DMF für 30 Minuten mit dem Harz zur Reaktion gebracht. Das Harz wurde nun fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH_2Cl_2 und fünfmal mit DMF gewaschen und 3 min mit einer Lösung von Pyridin/ Ac_2O (9:1) versetzt. Nach anschließendem fünfmaligen Waschen mit DMF und zehnmaligen Waschen mit CH_2Cl_2 wurde die Boc-Schutzgruppe mit einer Lösung aus 5 % m-Kresol in TFA für 3 Minuten entschützt. Das Harz wurde zehnmal mit CH_2Cl_2 und fünfmal mit DMF gewaschen. Der Kupplungszyklus wurde mit den entsprechenden Boc-geschützten Aminosäuren wiederholt bis das Volllängenpeptid am Harz aufgebaut wurde.

Freisetzung vom polymeren Träger: Um den Thioester vom Harz abzuspalten, wurde für eine Ansatzgröße von 10 μmol 1.5 ml einer Abspaltlösung von TFA/TFMSA/m-Kresol (80:15:5) hergestellt. Das Harz wurde für 1.5 Stunden in der Abspaltlösung geschüttelt. Die Abspaltlösung wurde dabei in die 8 bis 10 fache Menge über Trockeneis gekühlten Diethylether gegeben. Das Präzipitat wurde durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 4°C und $4300 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ abgetrennt. Durch wiederholtes Lösen des Präzipitats in TFA und weiteres Umfällen mit kaltem Diethylether wurde das Präzipitat von TFMSA befreit.

Aufreinigung des Rohproduktes: Das getrocknete Präzipitat wurde je nach Löslichkeit in der nötigen Menge Wasser bzw. einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser/TFA (59.1:40:0.1) aufgenommen und mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt.

6.3 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde im 25 μmol Maßstab durchgeführt. Peptidamide wurden am NovaSyn-TGR-Harz synthetisiert.

6.4 Selbstreinigende Peptidthioestersynthese

Synthese des 4-Sulfamylbutyryl-(PhiPr)glutamyl-Glycerin-Polystyrol-Harzes: 485 mg (500 μmol) PS-Harz (Beladung: $1.03 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$) wurden in einem Spritzenreaktor mit

Filterfritte in ca. 1 ml DMF 20 min gequollen. 595 mg (2 mmol, 4 Äq) Fmoc-Gly-OH, 1.04 g (2 mmol, 4 Äq) PyBOP und 1.02 ml (4 mmol, 8 Äq) DIPEA wurden in 10 ml DMF gelöst und auf das Harz gegeben und über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung abfiltriert und das Harz dreimal mit jeweils ca. 1 ml DMF, CH₂Cl₂ und wieder mit DMF gewaschen. Anschließend wurde das Harz 5 min mit einer Lösung aus DMF/Ac₂O/1,2-Lutidin 89:5:6 behandelt und wieder jeweils dreimal mit ca. 1 ml DMF, CH₂Cl₂ und DMF gewaschen. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt, indem das Harz zweimal 5 min mit einer DMF/Piperidin 4:1 Lösung behandelt wurde. Nach Abfiltrieren der Fmoc-Abspaltlösung wurde das Harz erneut dreimal jeweils mit ca. 1 ml DMF, CH₂Cl₂ und DMF gewaschen. 502 mg (1.03 mmol, 2 Äq) Fmoc-Glu(iPr)-OH, 352 mg (927 µmol, 1.8 mmol) HATU, 146 mg (1 mmol, 2 Äq) Oxyma und 362 µl (2.06 mmol, 4 Äq) DIPEA wurden in 3 ml DMF gelöst und auf das Harz gegeben und 2 h geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung abfiltriert und jeweils dreimal mit ca. 1 ml DMF, CH₂Cl₂ und DMF gewaschen. Anschließend wurde das Harz 5 min mit einer Lösung aus DMF/Ac₂O/1,2-Lutidin 89:5:6 behandelt und wieder jeweils dreimal mit ca. 1 ml DMF, CH₂Cl₂ und DMF gewaschen. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mithilfe entfernt, indem das Harz zweimal 5 min mit einer DMF/Piperidin 4:1 Lösung behandelt wurde. Nach Abfiltrieren der Fmoc-Abspaltlösung wurde das Harz erneut dreimal jeweils mit ca. 1 ml DMF, CH₂Cl₂ und DMF gewaschen. 233 mg (1.39 mmol, 2.7 Äq) 3-Sulfamoylpropansäure, 215 µl (1.39 mmol, 2.7 Äq) DIC und 188 mg (1.39 mmol, 2.7 Äq) HOBt wurden in 7 ml DMF gelöst, auf das Harz gegeben und 16 h lang geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Reaktionslösung wurde das Harz fünfmal mit DMF und zehnmal mit CH₂Cl₂ gewaschen. Anschließend wurde das Harz am Hochvakuum getrocknet. Die Ausbeute wurde über die Massendifferenzwägung bestimmt.

Tabelle 6: Die Bestimmung der Beladung des 4-Sulfamylbutyryl-(PhiPr)glutamyl-Glycerin-Polystyrol-Harzes.

Anfangsgewicht des Harzes		Neues Gewicht des Harzes		Ausbeute
mg	µmol	mg	Δmg	%
485	500	708	223	98

Die neue Beladung des Harzes betrug nun $0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Erstbeladung des 4-Sulfamylbutyryl-(PhiPr)glutamyl-Glycin-Polystyrol-Harzes: Chloroform und DIPEA wurden bei -25°C vorgekühlt. 142 mg ($100 \mu\text{mol}$) 4-Sulfamylbutyryl-(PhiPr)glutamyl-Glycin-Polystyrol-Harz (Beladung: $0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$) wurde in ca. 1 ml kalten Chloroform für 30 min gequollen. Das Chloroform wurde abfiltriert und 179 mg ($396 \mu\text{mol}$, 4 Äq) Fmoc-Lys(Alloc)-OH in 900 μl Chloroform und 594 μl DIPEA gelöst. 206 g ($396 \mu\text{mol}$, 4 Äq) PyBOP wurden in 500 μl kaltem Chloroform gelöst. Beide Lösungen wurden vereint, wodurch eine 0.2 M Lösung mit 30 vol% DIPEA der Aminosäure und PyBOP entstand. Diese Lösung wurde auf das bereits in Chloroform gequollene Harz gegeben und 2 h bei -25°C zur Reaktion gebracht. Die Suspension wurde ca. alle 30 min geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren der Reaktionslösung wurde der Schritt ein weiteres mal für 2 h bei -25°C wiederholt. Nach Abfiltrieren der Reaktionslösung wurde das Harz 5 min mit einer Lösung aus DMF/Ac₂O/1,2-Lutidin 89:5:6 behandelt und fünfmal mit DMF und zehnmal mit DCM gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden ca. 5 mg getrocknetes Harz aliquotiert und mit 1 ml DMF/Piperidin 4:1 versetzt, um die neue Beladung zu bestimmen. Das Harz wurde zweimal 5 min mit einer DMF/Piperidin 4:1 Lösung behandelt und fünfmal mit ca. 1 ml DMF, CH₂Cl₂ und DMF gewaschen

Aufbau der Peptidkette: Zum Aufbau des gewünschten Peptids wurde nach der Strategie aus Abschnitt 6.3 gearbeitet.

Kupplung des Zyklisierungslinkers: Das Harz wurde zweimal zwei Stunden mit einer Lösung aus 10 Äq des Zyklisierungslinkers **ZL** in 5 % NEt₃ in DMF (0.1 M) behandelt. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit DMF gewaschen. Zu dem Harz wurden 5 Minuten 1 ml Pyridin/Ac₂O (9:1) gegeben, anschließend wurde fünfmal mit DMF und zehnmal mit CH₂Cl₂ gewaschen.

Entschützung der Mmt- und PhiPr-Schutzgruppe: Zu dem Harz wurden zweimal 2 min 1 ml einer Lösung aus 1 % TFA in CH₂Cl₂ gegeben. Das Harz wurde nun so lange mit DCM gewaschen bis die Waschlösung farblos war. Anschließend wurde das Harz noch zehnmal mit DCM und fünfmal mit DMF gewaschen.

Macrocyclisierung: Das Harz wurde zweimal 2 h mit eine Lösung aus 8 Äq PyBOP (0.1 M), 8 Äq HOBt und 24 Äq DIPEA behandelt. Das Harz wurde fünfmal mit DMF, fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit DMF gewaschen.

Aktivierung: Das Harz wurde dreimal mit THF und dreimal mit absolutem THF gewaschen. Eine Lösung von 0.1 M TMS-CH₂N₂ (0.2 M in Hexan) in Hexan/THF(abs.) (1:1) wurde für zwei Stunden zum Harz gegeben. Das Harz wurde fünfmal mit THF und fünfmal mit CH₂Cl₂ und fünfmal mit DMF gewaschen.

Thiolyse: Für die Thiolyse wurde eine volle Beladung des Harzes angenommen (Anfangsbeladung des PS-Harzes: 1 mmol · g⁻¹). Das Harz wurde in einer Lösung aus 50 Äq **HSQ** (1 M) und Natriumthiophenolat 48 h geschüttelt. Anschließend wurde das Thiolyolat abfiltriert und das Harz fünfmal mit DMF, zehnmal mit DMSO, zehnmal mit 1 % TFA in CH₂Cl₂, zehnmal mit DMSO, zehnmal mit 1 % TFA in CH₂Cl₂ und fünfmal mit CH₂Cl₂ gewaschen.

Einführen von 5/6-Carboxyfluorescein: Zur Einführung von 5/6-Carboxyfluorescein wurde das Harz in CH₂Cl₂ gequollen. Eine Lösung aus 5 Äq 5/6-Carboxyfluorescein (0.07 M), 5 Äq HOBt und 5 Äq DIC in trockenen DMSO wurde in einem Sarstedtgefäß angesetzt. Eine weitere Lösung aus 1 Äq Pd(PPh₃)₄ (0.013 M) und 20 Äq PhSiH₃ wurden in einem separaten Sarstedt-Gefäß mit trockenen CH₂Cl₂ hergestellt. Die Lösungen wurden nacheinander in der Reihenfolge ihrer Herstellung auf das Harz gegeben. Das Harz wurde 2 h geschüttelt und anschließend so lange mit einer Lösung aus 0.5 % Natriumdiethyldithiocarbamat in DMF gewaschen bis das Harz seine Braunfärbung verliert (mindestens 50 ml). Anschließend wurde das Harz mit DMF und mit CH₂Cl₂ gewaschen.

Abspaltung vom polymeren Träger: Die Abspalllösung von TFA/m-Kresol/H₂O/TIS (85:5:5:5) mit 5 mg · ml⁻¹ H-Cys-OMe·HCl wurde für zwei Stunden zum Harz gegeben. Die Abspalllösung wurde in die acht bis zehnfache (zur Abspalllösung) Menge kalten Ether gegeben. Die Peptide wurden in H₂O/TFA (99.999:0.0001) gelagert.

6.5 Darstellung der fluorogenen Jun- und Fos-Peptide

Dabei wurde das Harz mit Fmoc-Lys(Mmt)-OH vorbeladen. Die Mmt-Schutzgruppe wurde mit 1% TFA in CH₂Cl₂ entschützt. Das mit CH₂Cl₂ gewaschene Harz wurde nach den Bedingungen in Abschnitt 6.2.1 mit Hexinsäure behandelt. Die Peptidsequenzen wurden mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese aufgebaut. Ausgehend von der Anfangsbeladung wurden die mit Volllängenpeptid beladenen Harze aus der automatisierten Festphasenpeptidsynthese mit CH₂Cl₂

gewaschen und am Vakuum getrocknet und in 10 μmol Aliquote aufgeteilt und in 4 ml Spritzenreaktoren überführt. Die Aliquote wurden in getrockneten DMF gequollen. In 2 ml Sarstedt-Gefäßen wurden 30 μmol (3 Äq) **123** vorgelegt. Eine zuvor hergestellte (trockenes DMF) Lösung aus CuI wurde durch Zentrifugation von den festen Bestandteilen getrennt. 2 ml des klaren Überstandes zu den 30 μmol **123** gegeben. Zu der roten Lösung wurden 40 μmol DIPEA gegeben. Die entstandene Lösung wurden auf die mit 10 μmol Aliquote Harz bestückten Spritzenreaktoren gegeben. Das Harz wurde mit DMF und anschließend mit CH_2Cl_2 gewaschen. Die Abspalllösung von TFA/m-Kresol/ H_2O /TIS (85:5:5:5) mit $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ H-Cys-OMe·HCl wurde für zwei Stunden zum Harz gegeben. Die Abspalllösung wurde in die acht bis zehnfache (zur Abspalllösung) Menge kalten Ether gegeben. Die Peptide wurden in H_2O /TFA (99.999:0.0001) gelagert.

6.5.1 Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von JunCTTE und FosCTTE

Zur Bestimmung der Konzentration der Stammlösungen von **JunCTTE** und **FosCTTE** wurde der Extinktionskoeffizient von **123** in H_2O /TFA (99.999:0.0001) mit Hilfe einer linearen Regression bestimmt. Bei unterschiedlichen Konzentrationen wurde die Absorption bei 280 nm beobachtet. Die lineare Regressionsgerade der Datenpunkte zeigt einen Extinktionskoeffizienten von ca. $9300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ an.

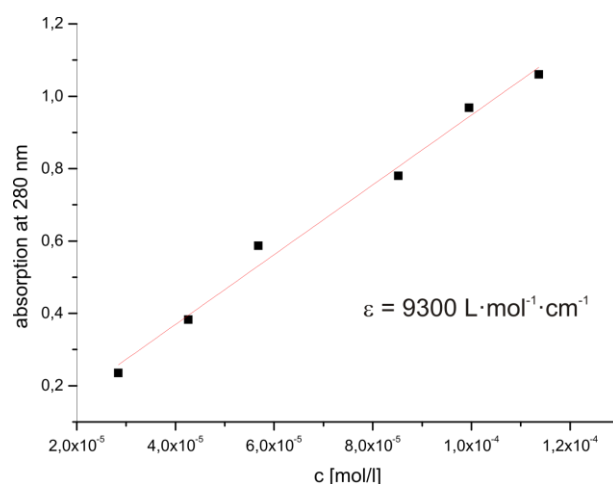


Abbildung 74: Bestimmung von $\epsilon_{280\text{nm}}$ von **123**.

6.6 Ligationsreaktionen

Die Peptide wurden in H₂O/TFA (99.999:0.0001) gelagert.

6.6.1 Staudinger-Ligation

Die Ligationsreaktionen wurden in 2 ml Sarstedt-Gefäßen mit einer Schraubkappe durchgeführt. Als wässriger Reaktions-Puffer wurde 100 mM NaH₂PO₄ bei pH 7.0 verwendet. Dieser wurde in einem 50 ml Sarstedt-Gefäß durch das Lösen von NaH₂PO₄ in MilliQ-Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde durch das Hinzufügen geeigneter Mengen 10 M NaOH und HCl eingestellt. Auf die Zugabe von TCEP wurde verzichtet. Eine vorzeitige Reduktion des Azidohomoalanins sollte verhindert werden. Vor den NCL-Reaktionen wurde der Puffer in einem mit einem Magnetrührer bestückten 100 ml Schlenk-Kolben 30 min bei ca. 20 mbar entgast und anschließend mit Argon geflutet. Diese Prozedur wurde fünfmal wiederholt, wobei hier das Vakuum nur für 1 min angelegt wurde. Die Konzentrationen der Peptid-Stammlösungen wurden mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten bei 214 nm erhalten. Dabei wurde der Extinktionskoeffizient des Orthophosphanbenzoesäureester, mit seinen drei Phenylringen, als drei Phenylalanine in die Rechnung mit einbezogen. Bei der Konzentrationsbestimmung des Azidohomoalaninpeptids wurde die Azidogruppe vernachlässigt. Für eine Ligationsreaktionen mit Peptidkonzentrationen von 0.5 mM wurden jeweils 250 nmol **88** und **99** und bei einer Peptidkonzentration von 0.05 mM jeweils 25 nmol **88** und **99** separat bis zur Trockne lyophilisiert. Das Azidohomoalaninpeptid **88** wurde in 500 µl Reaktionspuffer aufgenommen und vollständig gelöst. Die entstandene Lösung wurde zu der Trockne des ortho-Phosphinbenzoesäureesters **99** gegeben. Wurde die Reaktion Templat-gesteuert durchgeführt, wurden 125 nmol (bei 0.5 mM Peptidkonzentration) oder 12.5 nmol (bei 0.05 mM Peptidkonzentration) Templat zum Azidohomoalanin gegeben und mit diesem lyophilisiert. Aus der entstandenen Reaktionslösung wurden Aliquote von 20 µl (10 nmol bei 0.05 mM Peptidkonzentration und 20 nmol bei 0.5 mM Peptidkonzentration) wurden entnommen und in ein mit einem Glas-Einlass bestückten HPLC-Vial überführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µl TFA bei den ausgewählten Zeiten unterbrochen. Darauf wurde die Reaktionsmischung durch die Injektion von 1 µl in das UPLC-MS-System untersucht.

6.6.2 Natürliche chemische Peptidverknüpfung

Die Ligationsreaktionen wurden in 2 ml Sarstedt-Gefäßen mit einer Schraubkappe durchgeführt. Als wässriger Reaktions-Puffer wurde 100 mM NaH_2PO_4 , 2 mM TCEP, pH 7.0 verwendet. Dieser wurde in einem 50 ml Sarstedt-Gefäß durch das Lösen von NaH_2PO_4 und TCEP in MilliQ-Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde durch das Hinzufügen geeigneten Mengen 10 M NaOH und HCl eingestellt. Vor den NCL-Reaktionen wurde der Puffer in einem mit einem Magnetrührer bestückten 100 ml Schlenk-Kolben 30 min bei ca. 20 mbar entgast und anschließend mit Argon geflutet. Diese Prozedur wurde fünfmal wiederholt, wobei hier das Vakuum nur für 1 min angelegt wurde. Die Konzentrationen der Peptide-Stammlösungen wurden mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten bei 280 nm erhalten, wenn Tyrosin oder Tryptophan in der Sequenz enthalten waren. War dies nicht der Fall wurde der Extinktionskoeffizient bei 214 nm verwendet. Bei einer Reaktions-Konzentration von 5 mM wurden 750 nmol **106** und 750 nmol **107** in eine Lösung von 10 % TFA in Wasser gegeben und lyophilisiert. Der erhaltene Rückstand wurde in 150 μl entgasten Reaktions-Puffer aufgenommen. Aliquote von 10 μl (50 nmol) wurden entnommen und in ein mit einem Glas-Einlass bestückten HPLC-Vial überführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 μl TFA bei den ausgewählten Zeiten unterbrochen. Darauf wurde die Reaktionsmischung durch die Injektion von 1 μl in das UPLC-MS-System untersucht.

Die Templat-gesteuerten NCL-Reaktionen von **106**, **107** und **87** mit Peptidkonzentrationen von 50 μM wurden durchgeführt, indem 7.5 nmol bereits lyophilisiertes **106** und **107** in 150 μl Reaktionspuffer gelöst wurde um unmittelbar mit 3.75 nmol **87** aus der entsprechenden Stammlösung versetzt zu werden. Aliquote von 10 μl (0.5 nmol) wurden wieder in mit einem Glas-Einlass bestückten HPLC-Vial überführt.

Durch den Einsatz verschiedener Stoffmengen von **106**, **107** und **87** können andere Peptidkonzentrationen erreicht werden.

6.6.3 Fluorogene native chemische Peptidverknüpfung

Die fluorogenen Ligationen mit Peptidkonzentrationen von 50 μM und 5 μM wurden in schwarzen Fluoreszenzküvetten (QS 10.00 mm) durchgeführt. Im folgenden wird die Durchführung bei einer Peptidkonzentration von 5 μM gezeigt. Durch den Einsatz verschiedener Stoffmengen von **109**, **107** und **87** können andere Peptidkonzentrationen

erreicht werden. Als wässriger Reaktions-Puffer wurde 100 mM NaH_2PO_4 , 2 mM TCEP, pH 7.0 verwendet. Dieser wurde in einem 50 ml Sarstedt-Gefäß durch das Lösen von NaH_2PO_4 und TCEP in MilliQ-Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde durch das Hinzufügen geeigneten Mengen 10 M NaOH und HCl eingestellt. Vor den NCL-Reaktionen wurde der Puffer in einem mit einem Magnetrührer bestückten 100 ml Schlenk-Kolben 30 min bei ca. 20 mbar entgast und anschließend mit Argon geflutet. Diese Prozedur wurde fünfmal wiederholt, wobei hier das Vakuum nur für 1 min angelegt wurde. Die Konzentrationen der Peptid-Stammlösungen des Cysteinyl- und Templatmoleküls wurden mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten bei 214 nm erhalten. Die Konzentrationen des Peptidthioesters wurde bei einer Wellenlänge von 9300 $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt. In den Küvetten war bereits der entgaste Reaktionspuffer (100 mM NaH_2PO_4 , 2 mM TCEP, pH 7.0) vorgelegt. Es wurden 0.65 nmol (1 Äq) **107**, 0.325 nmol **87** (0.5 Äq) und 0.65 nmol (1 Äq) **109** nacheinander aus ihren Vorratslösungen in die Puffer bestückte Küvette pipettiert. Die erhaltenen Reaktionslösungen wurden mit einer 100 μl Pipette durchmischt. Küvetten wurden mit einer Plastikcappe verschlossen, um sofort im temperierten Küvettenhalter platziert zu werden. Für die Reaktion ohne Templatmolekül wurden 0.65 nmol (1 Äq) **107** und 0.65 nmol (1 Äq) **109** nacheinander aus ihren Vorratslösungen in die Puffer bestückte Küvette pipettiert. Um den Thioester zu hydrolysieren, wurden 0.65 nmol fluorogener Thioester in einen 2 ml Sarstedt-Gefäß mit 100 μl $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{aq}}$ bei 37°C für eine Stunde geschüttelt. Die Lösung verfärbte sich gelb. Das hydrolysierte Produkt wurde in 130 μl frisch entgasten Puffer aufgenommen. Die erhaltene Lösung wurde in eine schwarze Fluoreszenzküvette überführt. Die Küvette wurde mit einer Kappe verschlossen und in den temperierten Küvettenhalter gestellt. Zur Vermessung des Thioesters allein, wurde 0.65 nmol des Thioesters in eine schwarze Fluoreszenzküvette mit 130 μl frisch entgasten Puffer gegeben.

Die Fluoreszenzspektren unter den in 6.1.14 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

6.6.4 Ligationsreaktionen mit DNA als Templatmolekül

Die fluorogenen Ligationen mit einer Peptidkonzentration von 0.5 μM wurden in schwarzen Fluoreszenzküvetten (QS 10.00 mm) durchgeführt. Als wässriger Reaktions-Puffer wurde 100 mM NaH_2PO_4 , 100 μM TCEP, 0.1% „Roche blocking agent“ pH 7.0 verwendet. Dieser wurde in einem 50 ml Sarstedt-Gefäß durch das Lösen von NaH_2PO_4

und TCEP in MilliQ-Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde durch das Hinzufügen geeigneten Mengen 10 M NaOH und HCl eingestellt. 1 ml Aliquoute des entgasten Puffers wurden in 2 ml Sarstedtgefäße wurden die beiden kommerziell erworbenen DNA-Einzelstränge in äquimolaren Mengen zusammen pipettiert und hybridisiert, indem sie auf 90 °C hochgeheizt und langsam (1 K/min) auf 20 °C abgekühlt wurden. Die Konzentrationen der Peptidthioesters wurde bei einer Wellenlänge von 9300 L mol⁻¹ cm⁻¹ bestimmt. In den Küvetten war bereits der entgaste Reaktionspuffer (100 mM NaH₂PO₄, 2 mM TCEP, pH 7.0) vorgelegt. Es wurden 0.5 nmol von **JunCTTE** (1 Äq) oder **FosCTTE** (1 Äq) in drei von vier mit 1 ml Reaktionspuffer bestückte schwarze Fluoreszenzküvetten überführt. Um den Thioester zu hydrolysieren, wurden 0.5 nmol fluorogener Thioester in einen 2 ml Sarstedt-Gefäß mit 100 µl NH₄OH_{aq} bei 37°C für eine Stunde geschüttelt. Das hydrolysierte Produkt wurde in 1 ml frisch entgasten Puffer aufgenommen. Die erhaltene Lösung wurde in die vierte schwarze Fluoreszenzküvette überführt. In die erste und die zweite schwarze Fluoreszenzküvette wurden 0.5 nmol zum Thioester komplementäres Cysteinylpeptid **FosCTCys** (1 Äq) oder **JunCTCys** (1 Äq) gegeben. In die erste schwarze Fluoreszenzküvette wurden schließlich 0.5 nmol Doppelsträngige DNA hinzugefügt. Alle Küvetten wurden mit einer 1 ml Pipette durchmischt und mit einer Kappe verschlossen und im temperierten Küvettenhalter gestellt.

Die Fluoreszenzspektren unter den in 6.1.14 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

6.6.5 Ligationsreaktionen mit Antikörper als Templatmolekül

6.6.5.1 Nichtfluorogene Ligationsreaktion auf Antikörpern

- Zum Antikörper: Als Antikörper wurde ein kommerziell erhältliche monoklonaler ANTI-FLAG M2 Antikörper der Firma Sigma-Aldrich (F1804) erworben. Das Suffix M2 beschreibt die Klonungs- und Aufreinigungsmethode zur Herstellung des Antikörpers. Der Antikörper wurde in der Maus hergestellt und mit Hilfe eines hochselektiven affinitätschromatographischen Verfahrens isoliert. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml ausgeliefert (MW_{ANTI FLAG M2} = 160000 Da → molare Konzentration c = 6.25 µM).

Die Ligationsreaktionen wurden in 2 ml Sarstedt-Gefäßen mit einer Schraubkappe durchgeführt. Da die Vorratslösung des Antikörpers sehr niedrig konzentriert war, wurden die Ligationen direkt in der aliquotierten Antikörpervorratslösung durchgeführt.

Zusätzlich wurde TCEP als Reduktionsmittel beigelegt. So wurde als wässriger Reaktions-Puffer 10 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 50% Glycerin, 2 mM TCEP bei pH 7.4 durchgeführt. Für eine Peptidkonzentration von 50 µM wurden 8 nmol Cysteinylpeptid **125** und 8 nmol Mercaptopropionsäurethioester **124** in 100 µl 10%ige essigsäure wässrige Lösung in einen 2 ml Sarstedt-Gefäß pipettiert. Die Lösung wurde bis zur Trockne gefriergetrocknet. Zur Durchführung der Templat-gesteuerten Reaktion wurden 160 µl (1 nm ANTI-FLAG Antikörper, 12.5mol%) der Antikörpervorratslösung zu den Peptiden gegeben und sorgfältig vermischt und anschließend sofort abzentrifugiert. Je nach gewünschter Reaktionstemperatur wurden die verschlossenen Sarstedt-Gefäße in einen 37 °C oder 22 °C (r.t.) temperierten Schüttler überführt. Betrug die Peptidkonzentration 10 µM wurden 8 nmol Cysteinylpeptid **125** und 8 nmol Mercaptopropionsäurethioester **124** in 100 µl 10%ige essigsäure wässrige Lösung in einen 2 ml Sarstedt-Gefäß pipettiert. Die Lösung wurde bis zur Trockne gefriergetrocknet. Zur Durchführung der Templat-gesteuerten Reaktion wurden 160 µl (1 nm ANTI-FLAG Antikörper, 12.5 mol%) der Antikörpervorratslösung (pH 7.4) zu den Peptiden gegeben und sorgfältig vermischt und anschließend sofort abzentrifugiert. Je nach gewünschter Reaktionstemperatur wurden die verschlossenen Sarstedt-Gefäße in einen 37 °C oder 22 °C (r.t.) temperierten Probenschüttler überführt. War die Ligationsreaktion nicht Templat-gesteuert, wurden 160 µl Reaktionspuffer (10 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 50% Glycerin, 2 mM TCEP bei pH 7.4) hinzugefügt. Aliquote von 20 µl wurden entnommen und in ein mit einem Glas-Einlass bestückten HPLC-Vial überführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µl TFA bei den ausgewählten Zeiten unterbrochen. Darauf wurde die Reaktionsmischung durch die Injektion von 1 µl in das UPLC-MS-System untersucht.

6.6.5.2 fluorogene Ligationsreaktion mit Antikörpern als Templatmolekül

Die fluorogenen Ligationen mit einer Peptidkonzentration wurden in schwarzen Fluoreszenzküvetten (QS 10.00 mm) durchgeführt. Als wässriger Reaktions-Puffer wurde 10 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 8% Glycerin, 2 mM TCEP bei pH 7.4 verwendet. In ein 2 ml Sarstedt-Gefäß wurden 1 nmol des benötigten Thioesters und 1 nmol des benötigten Cysteinylpeptids in 840 µl 10 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 2.4 mM TCEP bei pH 7.4 gelöst. Zu dieser Lösung wurden 160 µl der ANTI-FLAG Antikörper Vorratslösung hinzugefügt. Die Lösung wurde sorgfältig durchmischt um

die Schlieren vom Glycerin aufzulösen. Schnell wurde die Reaktionslösung in 1 ml schwarze Fluoreszenzküvetten überführt und bei Raumtemperatur in den Küvettenhalter des Fluoreszenzspektrometers gegeben und mit einer Kappe verschlossen. Bei der nicht Templat-gesteuerten fluorogenen nativen chemischen Peptidverknüpfung wurden 1 nmol des benötigten Thioesters und 1 nmol des benötigten Cysteinylopeptids in 1 ml 10 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 8% Glycerin, 2 mM TCEP bei pH 7.4 gelöst und in schwarze 1 ml Fluoreszenzküvetten überführt und mit einer Kappe verschlossen.

6.6.5.3 Stabilität des ANTI-FLAG Antikörpers gegenüber TCEP

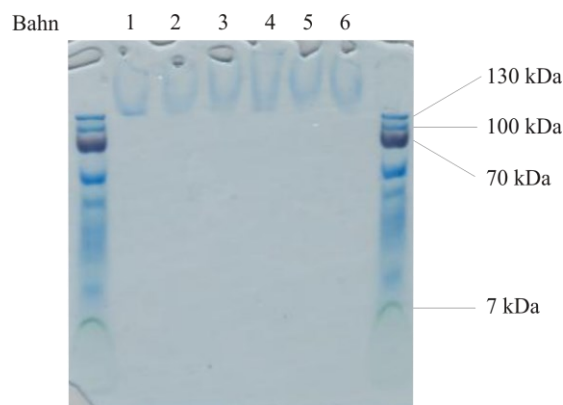
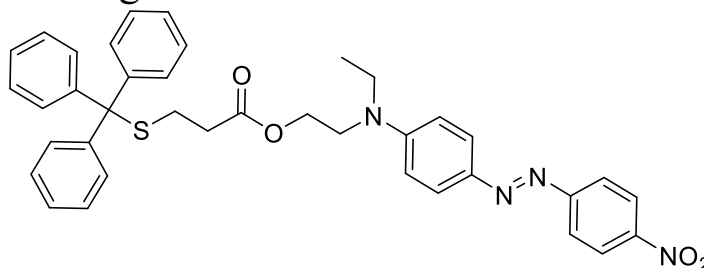


Abbildung 75: Bahn 1: ANTI-FLAG Antikörper in Vorratslösung (Zeitpunkt 0 h); Bahn 2: ANTI-FLAG Antikörper in Ligationspuffer (2.4 mM TCEP, Zeitpunkt: 0 h). Bahn 3: ANTI-FLAG Antikörper in Ligationspuffer (ohne TCEP, Zeitpunkt: 0 h). Bahn 4: ANTI-FLAG Antikörper in Vorratslösung (Zeitpunkt: 0 h). Bahn 5: ANTI-FLAG Antikörper in Ligationspuffer (2.4 mM TCEP, Zeitpunkt: 3 h). Bahn 6: ANTI-FLAG Antikörper in Ligationspuffer (ohne TCEP, Zeitpunkt: 3 h).

Sowohl zu Beginn der Reaktion (0h), als auch nach 3 h konnten keine Fragmente des ANTI-FLAG Antikörpers, welche auf ein Zersetzen des Antikörpers hinweisen, nachgewiesen werden.

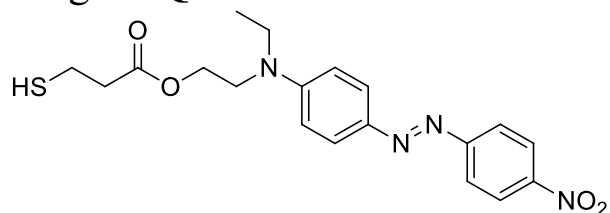
6.7 Chemische Synthese

6.7.1 Verbindung 112:



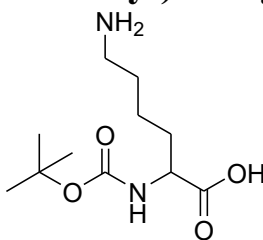
3 g (9.55 mmol, 1 Äq.) N-ethyl-N-(2-hydroxyethyl)-4-(4-nitrophenylazo)anilin,
3.7 g (10.5 mmol, 1.1 Äq.) S-Trityl-3-Mercaptopropionsäure, 134 mg
(1.1 mmol, 0.1 Äq.) 4-(Dimethylamino)-pyridin wurden in 50 ml Dimethylformamid
unter ständigen Rühren gelöst. Die Lösung wurde 15 min auf Eis gekühlt und
anschließend mit 3.02 g (15.8 mmol, 1.5 Äq.) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-
ethylcarbodiimid Hydrochlorid versetzt. Nach weiteren 15 min Rühren auf Eis wurde
die Lösung 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltende Reaktionslösung wurde
unter verminderten Druck vom Lösungsmittel befreit und direkt
säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Dichlormethan). Es wurden 5.60 g
(8.69 mmol, 89%) Produkt als roter, schaumiger Feststoff isoliert. ¹H-NMR
(500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.33 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H),
7.80 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.36 – 7.16 (m, 15H), 6.84 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 4.20 (t, *J* = 5.3
Hz, 2H), 3.65 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.45 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.18
(t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.10 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 171.13 (C_q),
156.15 (C_q), 151.52 (C_q), 146.82 (C_q), 144.24 (C_q), 142.83 (C_q), 129.04 (CH), 128.01
(CH), 126.04 (CH), 124.92 (CH), 122.46 (CH), 111.58 (CH), 66.24 (CH₂), 61.65 (CH₂),
48.12 (CH₂), 44.92 (CH₂), 32.84 (CH₂), 26.36 (CH₂), 11.94 (CH₃).

6.7.2 Verbindung HSQ:



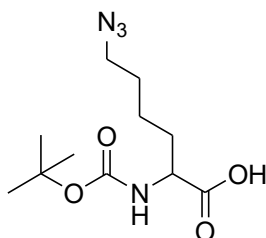
5.48 g (8.5 mmol) S-Trityl-3-Mercaptopropionsäure *N*-Ethyl-*N*-(2-hydroxyethyl)-4-(4-nitrophenylazo)anilin und 3.5 ml Triisopropylsilan wurden in 40 ml Dichlormethan gelöst und mit 10 ml Trifluoressigsäure versetzt und 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur Trockne eingeeengt und säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Dichlormethan/Methanol 100:0 → 97:3) aufgereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden unter verminderten Druck vom Lösungsmittel befreit und in 200 ml Dichlormethan aufgenommen um dreimal mit 50 ml gesättigter NaHCO_{3, aq}, zweimal mit Wasser und einmal mit gesättigter NaCl_{aq} gewaschen zu werden. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet eingeeengt und am Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit. Es wurden 3.4 g (8.5 mmol, 99%) eines roten Feststoffs erhalten. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 8.34-8.31 (m, 2H), 7.95-7.92 (m, 4H), 6.87-6.84 (m, 2H), 4.37 (m, 2H), 3.75 (m, 2H), 3.58 (m, 2H), 2.76 (m, 2H), 2.67 (m, 2H), 1.64 (t, 1H), 1.29 (m, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) [ppm] = 171.54 (C_q) 155.88 (C_q), 151.77(C_q), 147.34 (C_q), 143.45 (C_q), 126.95 (CH), 124.75 (CH), 122.39 (CH), 111.94 (CH), 61.50 (CH₂), 48.91 (CH₂), 45.94 (CH₂), 38.29 (CH₂), 19.59 (CH₂), 12.30 (CH₃).

6.7.3 N α -(tert-Butoxycarbonyl)-L-Lysin:



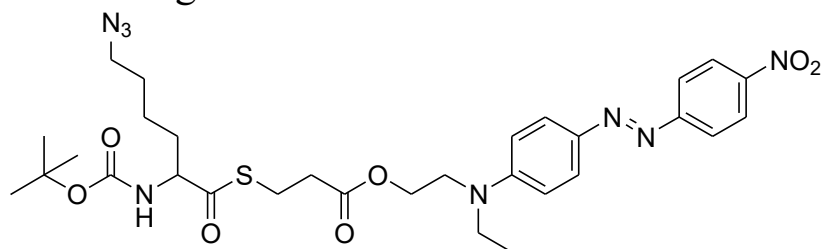
1 g (2.13 mmol) N α -(tert-Butoxycarbonyl)-N ϵ -(Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-lysine wurden in 10 ml Dimethylformamid/Piperidin 1:4 gelöst und 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter verminderten Druck und anschließend am Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit und in 50 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die wässrige Phase wurde in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Es konnten 498 mg (2.03 mmol, 95%) eines weißen Feststoffs isoliert werden. ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ [ppm] = 3.87 – 3.83 (m, 1H), 2.96 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.74 – 1.57 (m, 4H), 1.40 (s, 11H). ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ = 179.51 (C_q), 157.42 (C_q), 80.77 (C_q), 55.68 (CH), 39.18 (CH₂), 31.37 (CH₂), 27.75 (CH₃), 26.36 (CH₂), 22.08 (CH₂).

6.7.4 Verbindung 120:



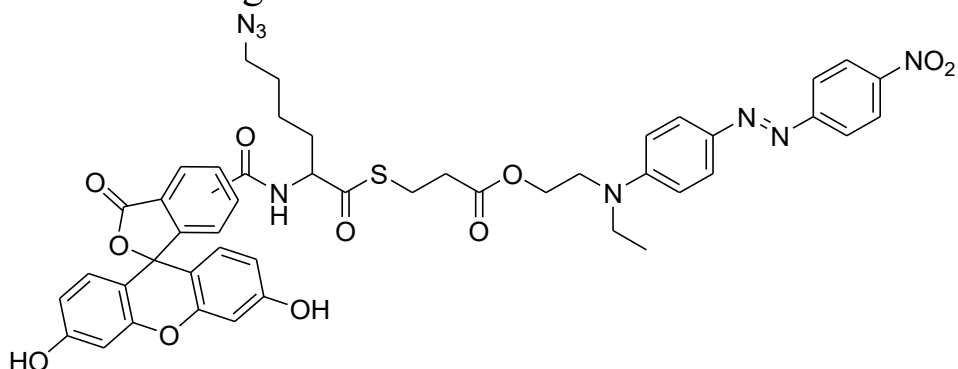
1 g (4.06 mmol) N_α -(tert-Butoxycarbonyl)-L-Lysin, 10 mg (0.04 mmol) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.744 mg K_2CO_3 wurden in 20 ml Methanol gelöst. Anschließend wurden 1.02 g (4.9 mmol) Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride³⁰³ portionsweise hinzugegeben und 16 h lang gerührt. Die Reaktionslösung wurde unter verminderten Druck aufkonzentriert und in 60 ml Wasser aufgenommen und mit konzentrierter HCl_{aq} angesäuert (bis pH 3) und anschließend dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und unter verminderten Druck vom Lösungsmittel befreit. Es konnten 917 mg (3.36 mmol, 83%) eines zähflüssigen Gels isoliert werden. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 10.36 (b, 1H) 4.36 – 4.29 (m, 1H), 3.30 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 1.90 – 1.70 (m, 1H), 1.67 – 1.57 (m, 3H), 1.44 (s, 11H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ = 13C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 176.95 (C_q), 155.65 (C_q), 80.37 (C_q), 56.86 (CH), 51.12 (CH_2), 31.96 (CH_2), 28.40 (CH_2), 28.28 (CH_3), 22.53 (CH_2).

6.7.5 Verbindung **121**:



1g (3.67 mmol, Äq) **120**, 1.63 g (4 mmol, 1.1 Äq) **HSQ** und 45 mg (0.37 mmol, 0.1 Äq) wurden in 35 ml Dimethylformamid unter ständigen Rühren gelöst. Die Lösung wurde 15 min auf Eis gekühlt und anschließend mit 3.02 g (15.8 mmol, 1.5 Äq) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid Hydrochlorid versetzt. Nach weiteren 15 min Rühren auf Eis wurde die Lösung 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltende Reaktionslösung wurde unter verminderten Druck vom Lösungsmittel befreit und direkt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Dichlormethan/Methanol 100:0 → 97:3). Es wurden 1.84 g (2.93 mmol, 80 %) eines tiefroten Feststoffs isoliert. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 8.33 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.94 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 4.33 (t, *J* = 6.2 Hz, 3H), 3.71 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.71 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.55 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.27 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.11 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.80 – 1.32 (m, 15H), 1.27 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 201.10 (C_q), 171.48 (C_q), 156.64 (C_q), 155.18 (C_q), 151.25 (C_q), 147.43 (C_q), 143.80 (C_q), 126.35 (CH), 124.69 (CH), 122.65 (CH), 111.49 (CH), 80.51 (C_q), 61.65 (CH₂), 60.29 (CH), 51.05 (CH₂), 48.68 (CH₂), 45.70 (CH₂), 34.13 (CH₂), 32.18 (CH₂), 28.36 (CH₂), 28.31 (CH₃), 23.70 (CH₂), 22.59 (CH₂), 12.28 (CH₃).

6.7.7 Verbindung **123**:



650 mg (1.7 mmol, 1 Äq.) 5/6-Carboxyfluorescein, 898 g (1.7 mmol, 1.1 Äq) **122**, 884 mg (1.7 mmol, 1 Äq) PyBOP und 1184 µl (1.7 mmol, 4 Äq) wurden in 20 ml Dimethylformamid unter ständigen Rühren gelöst. Die Lösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltende Reaktionslösung wurde unter verminderten Druck vom Lösungsmittel befreit und direkt säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Dichlormethan/Methanol 100:0 → 97:3). Es wurden 1.24 g (1.40 mmol, 70%) Produkt als roter Feststoff isoliert. ¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ[ppm] = 10.17 (broad, 1H), 8.59 + 7.74 (s, 1H), 8.34 (dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 2H), 8.29 + 8.23 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H), 8.14 + 7.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 9.0, 2.9 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.88 (m, 2H), 6.88 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 6.65 – 6.46 (m, 4H), 4.70 – 4.42 (m, 1H), 4.33 – 4.10 (m, 2H), 3.79 – 3.60 (m, 2H), 3.55 – 3.46 (m, 2H), 3.36 – 3.20 (m, 2H), 3.07 – 2.90 (m, 2H), 2.66 – 2.54 (m, 2H), 1.97 – 1.63 (m, 2H), 1.62 – 1.27 (m, 4H), 1.11 (dt, *J* = 14.4, 7.1 Hz, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 201.00 (C_q), 171.17 (C_q), 168.15 (C_q), 165.50 (C_q), 159.84 (C_q), 156.19 (C_q), 155.04 (C_q), 151.91 (C_q), 151.55 (C_q), 146.90 (C_q), 142.86 (C_q), 139.63 (C_q), 135.27 (C_q), 132.15 (C_q), 129.32 (CH), 128.92 (CH), 128.22 (CH), 126.08 (CH), 125.33 (CH), 124.96 (CH), 124.54 (CH), 123.76 (CH), 122.82 (CH), 122.51 (CH), 112.81 (CH), 111.66 (CH), 109.14 (C_q), 109.02 (C_q), 102.34 (CH), 61.74 (CH₂), 59.94 (CH), 50.48 (CH₂), 48.20 (CH₂), 45.05 (CH₂), 33.56 (CH₂), 30.06 (CH₂), 27.82 (CH₂), 23.28 (CH₂), 22.83 (CH₂), 12.02 (CH₃).

6.8 Zusätzliche Ligationsreaktion aus Abschnitt 4.5.1

6.8.1 129a+131a

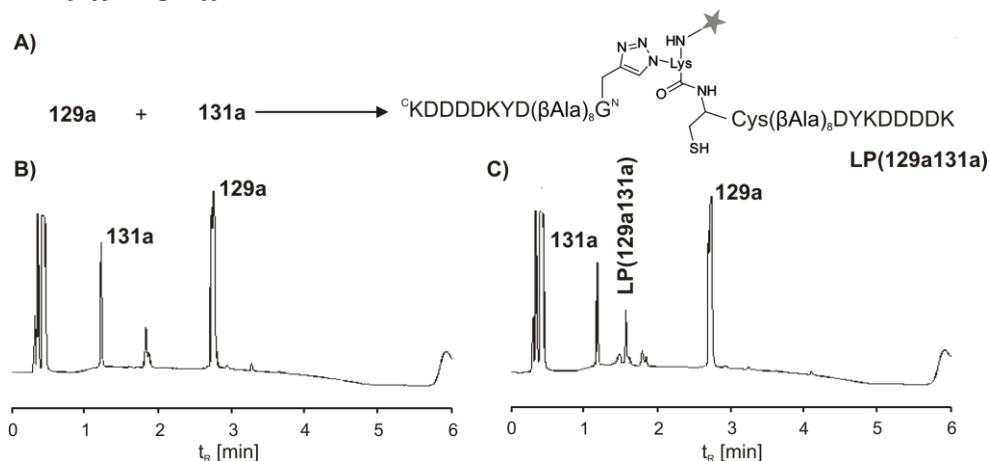


Abbildung 76: A) Native chemische Peptidverknüpfung von **129a** und **131a** bei einer Peptidkonzentration von 1 mM zum Reaktionsprodukt **LP(129a131a)**. B) Chromatogramm der genannten Reaktion zum Zeitpunkt von 0 min C) und 180 min. Gesuchte Masse von **LP(129a131a)**: gesuchte Masse: 3871,9. Gefundene Masse: 3871,9 durch $[M+4H]^{4+}=968,99$.

6.8.2 129b+131a

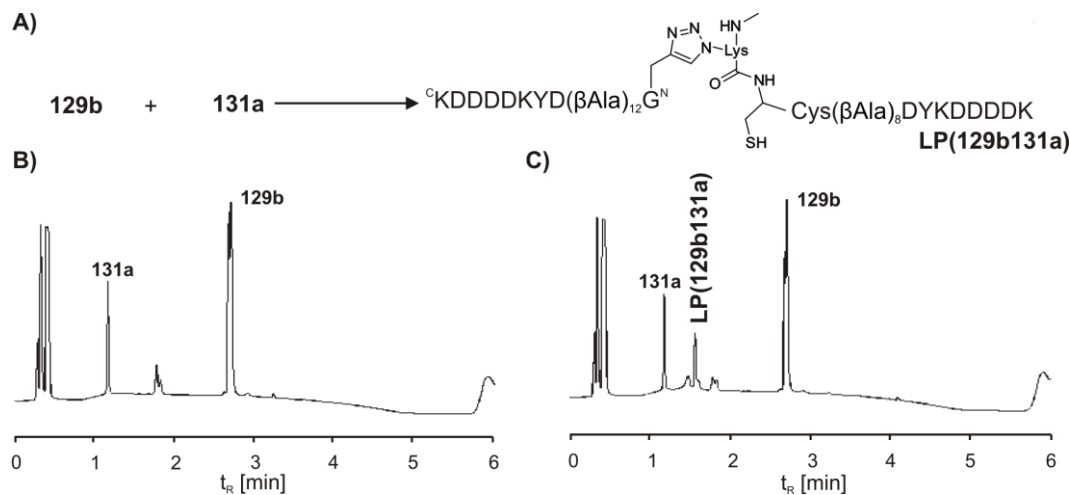


Abbildung 77: A) Native chemische Peptidverknüpfung von **129b** und **131a** bei einer Peptidkonzentration von 1 mM zum Reaktionsprodukt **LP(129b131a)**. B) Chromatogramm der genannten Reaktion zum Zeitpunkt von 0 min C) und 180 min. Gesuchte Masse von **LP(129b131a)**: gesuchte Masse: 4156,75. Gefundene Masse: 4154,65 durch $[M+4H]^{4+} = 1039,67$.

6.8.3 129c+131a

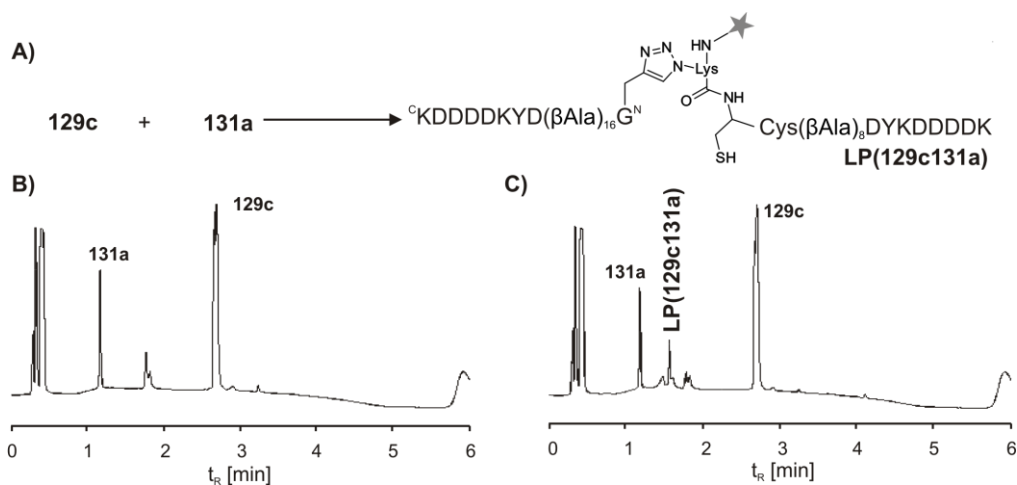


Abbildung 78: A) Native chemische Peptidverknüpfung von **129c** und **131a** bei einer Peptidkonzentration von 1 mM zum Reaktionsprodukt **LP(129c131a)**. B) Chromatogramm der genannten Reaktion zum Zeitpunkt von 0 min C) und 180 min. Gesuchte Masse von **LP(129c131a)**: gesuchte Masse: 4440,22. Gefundene Masse: 4440,21 durch $[M+4H]^{4+} = 1111,06$.

6.8.4 129d+131a

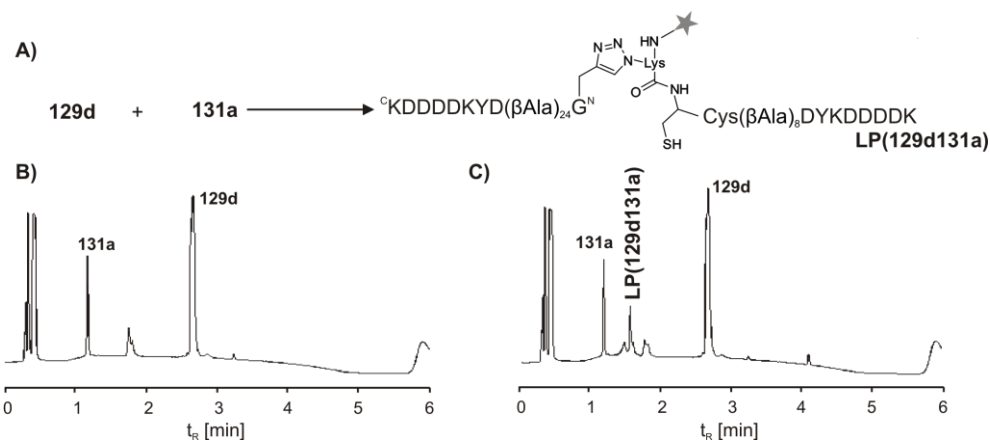


Abbildung 79: A) Native chemische Peptidverknüpfung von **129d** und **131a** bei einer Peptidkonzentration von 1 mM zum Reaktionsprodukt **LP(129d131a)**. B) Chromatogramm der genannten Reaktion zum Zeitpunkt von 0 min C) und 180 min. Gesuchte Masse von **LP(129d131a)**: gesuchte Masse: 5010,13. Gefundene Masse: 5009,11 durch $[M+6H]^{6+} = 835,86$.

6.8.5 129a+131b

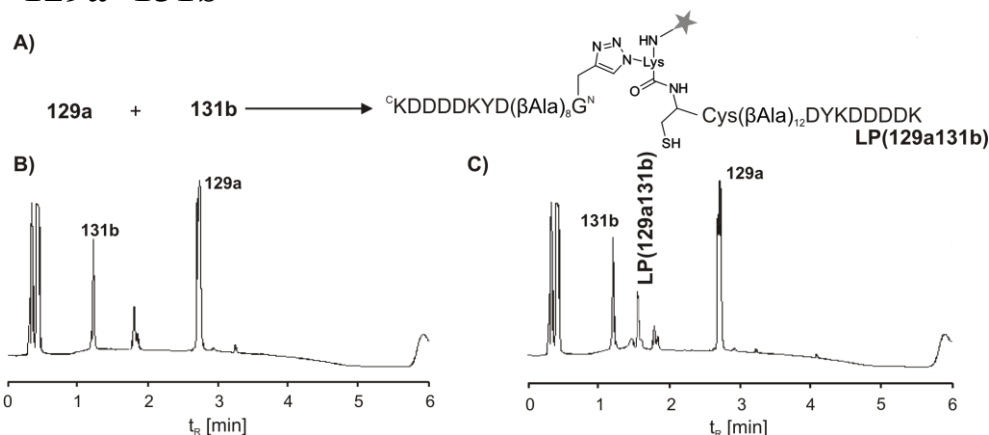


Abbildung 80: A) Native chemische Peptidverknüpfung von **129a** und **131b** bei einer Peptidkonzentration von 1 mM zum Reaktionsprodukt **LP(129a131b)**. B) Chromatogramm der genannten Reaktion zum Zeitpunkt von 0 min C) und 180 min. Gesuchte Masse von **LP129a131b**: gesuchte Masse: 4156,21. Gefundene Masse: 4155,05 durch $[M+4H]^{4+} = 1039,77$.

6.8.6 129b+131b

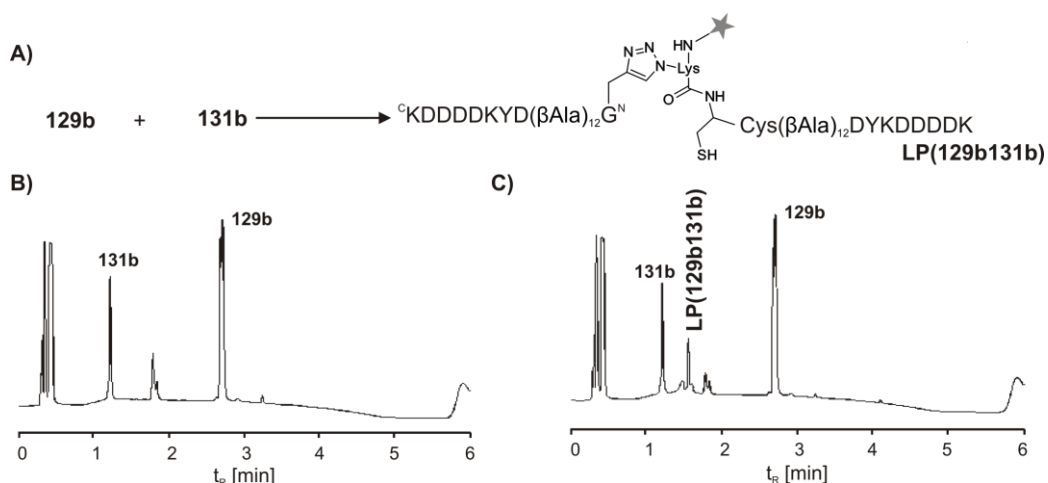


Abbildung 81: A) Native chemische Peptidverknüpfung von **129b** und **131b** bei einer Peptidkonzentration von 1 mM zum Reaktionsprodukt **LP(129b131b)**. B) Chromatogramm der genannten Reaktion zum Zeitpunkt von 0 min C) und 180 min. Gesuchte Masse von **LP(129b131b)**: gesuchte Masse: 4441,06. Gefundene Masse: 4439,81 durch $[M+4H]^{4+} = 1110,96$.

6.8.7 129c+131b

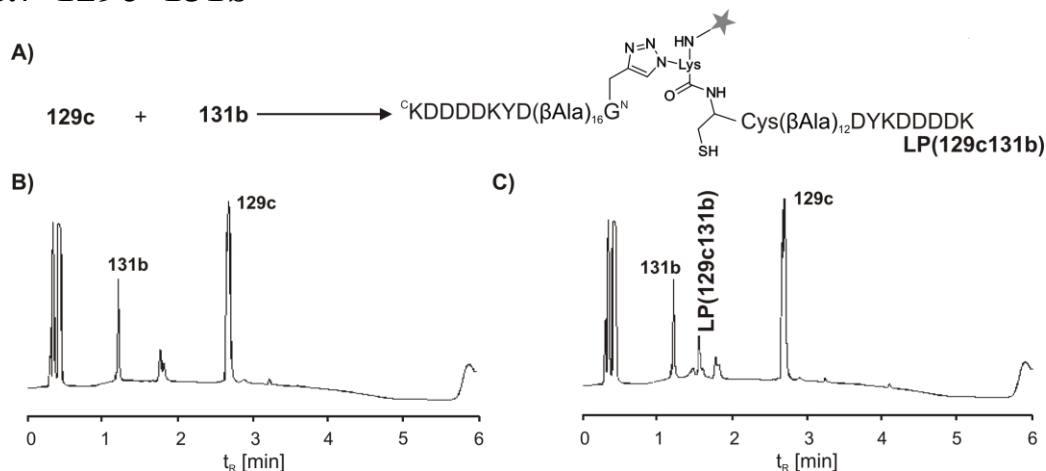


Abbildung 82: A) Native chemische Peptidverknüpfung von **129c** und **131b** bei einer Peptidkonzentration von 1 mM zum Reaktionsprodukt **LP(129c131b)**. B) Chromatogramm der genannten Reaktion zum Zeitpunkt von 0 min C) und 180 min. Gesuchte Masse von **LP(129c131b)**: gesuchte Masse: 4724,53. Gefundene Masse: 4724,21 durch $[M+4H]^{4+} = 1182,06$.

6.8.8 129d+131b

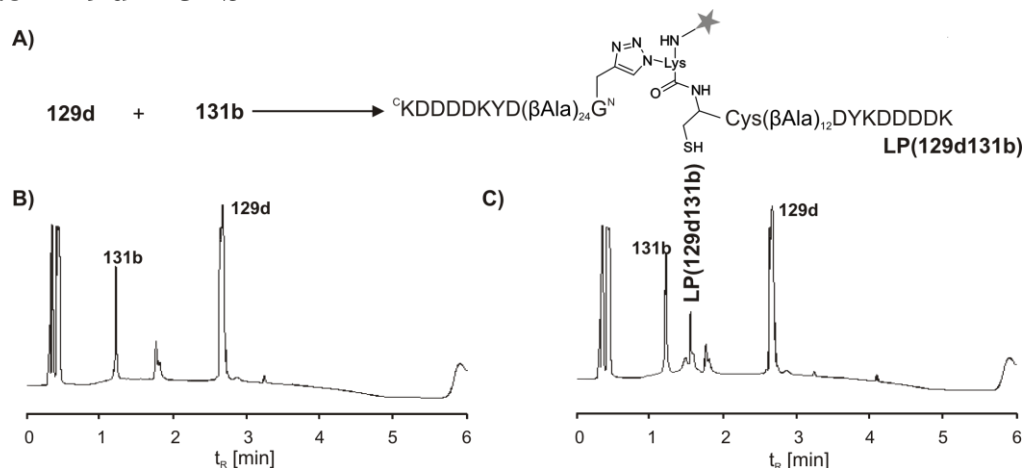


Abbildung 83: A) Native chemische Peptidverknüpfung von **129d** und **131b** bei einer Peptidkonzentration von 1 mM zum Reaktionsprodukt **LP(129d131b)**. B) Chromatogramm der genannten Reaktion zum Zeitpunkt von 0 min C) und 180 min. Gesuchte Masse von **LP(129d131b)**: gesuchte Masse: 5294,44. Gefundene Masse: 5293,94 durch $[M+6H]^{6+} = 883,33$.

6.9 Charakterisierung der Peptide

6.9.1 Peptide aus Abschnitt 4.1

6.9.1.1 Peptid 87



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3.25 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 810 nmol (25%).

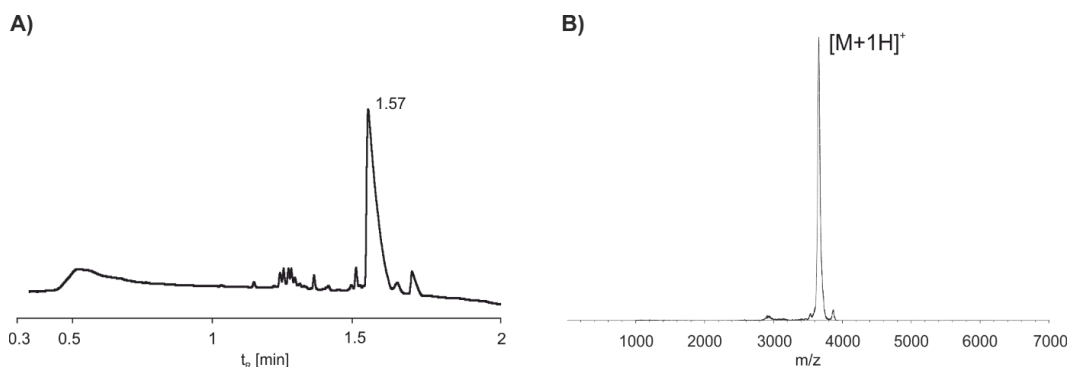
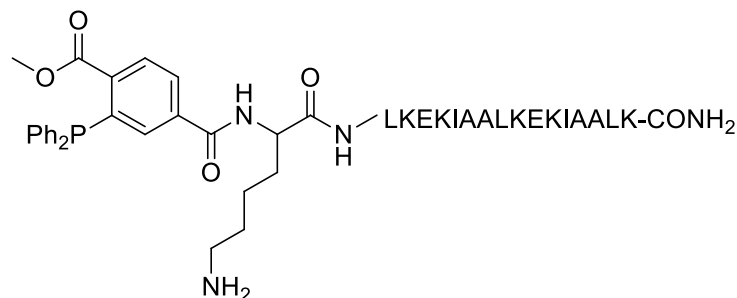


Abbildung 84: A) UPLC: $t_R = 1.57$ min (3% B \rightarrow 90% B in 2 min). B) MALDI-TOF-MS: $m/z = 3666.5$ ($\text{C}_{164}\text{H}_{282}\text{N}_{39}\text{O}_{54}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 3664.21).

6.9.1.2 Peptid 99



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll bis zu 17Lys durchgeführt. Anschließend wurde **93**·**BH**₃ manuell auf 17Lys gekuppelt. (4 Äq **93**·**BH**₃, 4 Äq PyBOP, 4 Äq Oxyma, 4 Äq DIEA unter Argon in DMF/CH₂Cl₂ (1:1) bei Raumtemperatur.) 9.4 μM wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 1.7 μmol (18%).

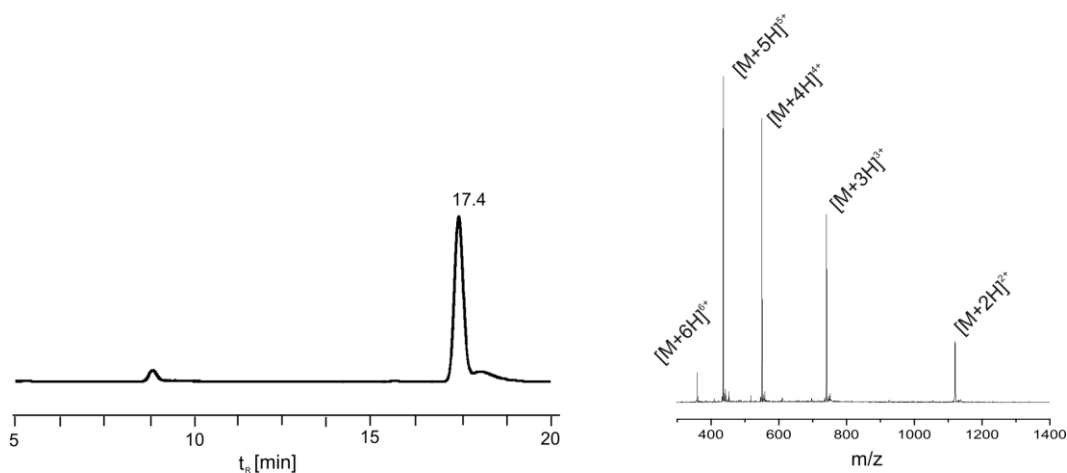
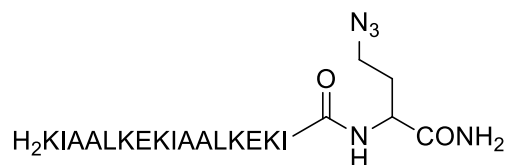


Abbildung 85: **A)** HPLC: $t_R = 17.4$ min (3% B \rightarrow 90% B in 20 min). **B)** ESI-MS: 2241.0 Da, m/z: $[M+6H]^{6+}$: 374.6; $[M+5H]^{5+}$: 449.4; $[M+4H]^{4+}$: 561.2; $[M+3H]^{3+}$: 747.8; $[M+2H]^{2+}$: 1121.0; ($C_{109}H_{179}N_{24}O_{24}P$, 2240.8 Da).

6.9.1.3 Peptid 88



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 µmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von ~ 3 µM wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 2.2 µmol (76%).

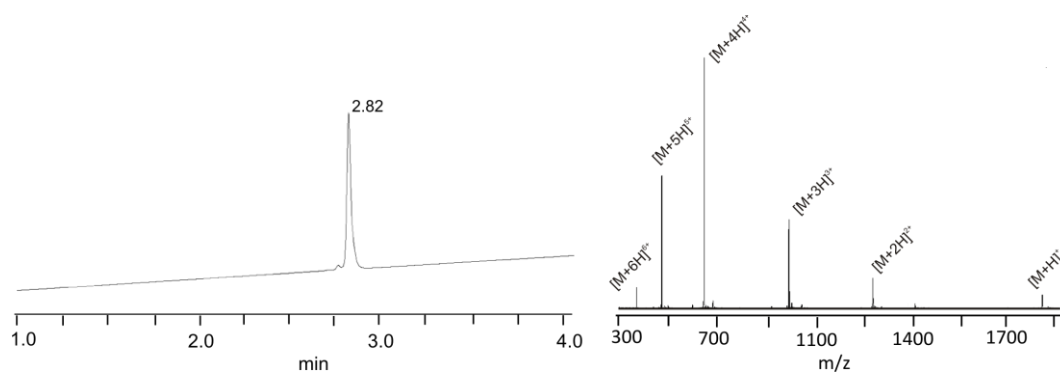


Abbildung 86: A) UPLC: $t_R = 2.82$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 1892.1 Da, m/z: [M+5H]⁵⁺: 379,5; [M+4H]⁴⁺: 474.1; [M+3H]³⁺: 631.7; [M+2H]²⁺: 947.1 [M+H]⁺: 1892.3; (C₈₆H₁₅₈N₂₆O₂₁, 1892.4 Da).

6.9.2 Peptide aus Abschnitt 4.2 und 4.3

6.9.2.1 Peptid 106



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 10 μmol Maßstab auf einem Mercaptopropionsäure beladenes MBHA Harz (21.7 mg, 0.46 mmol/mg) mit Hilfe der manuellen Festphasenpeptidsynthese nach Boc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 2.01 μmol (67%).

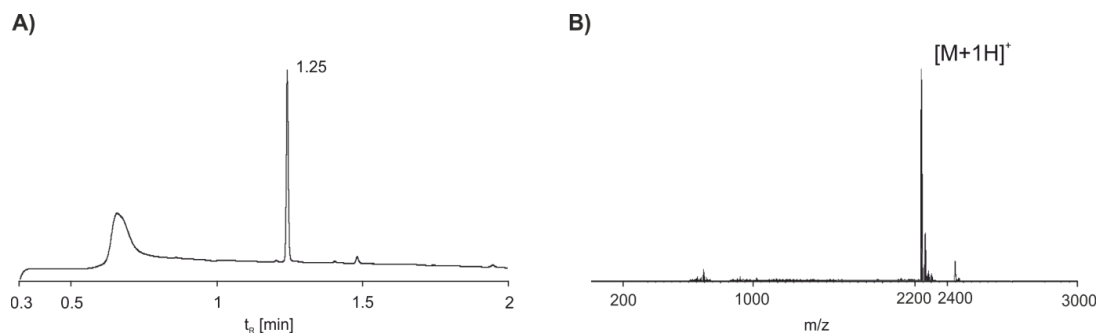
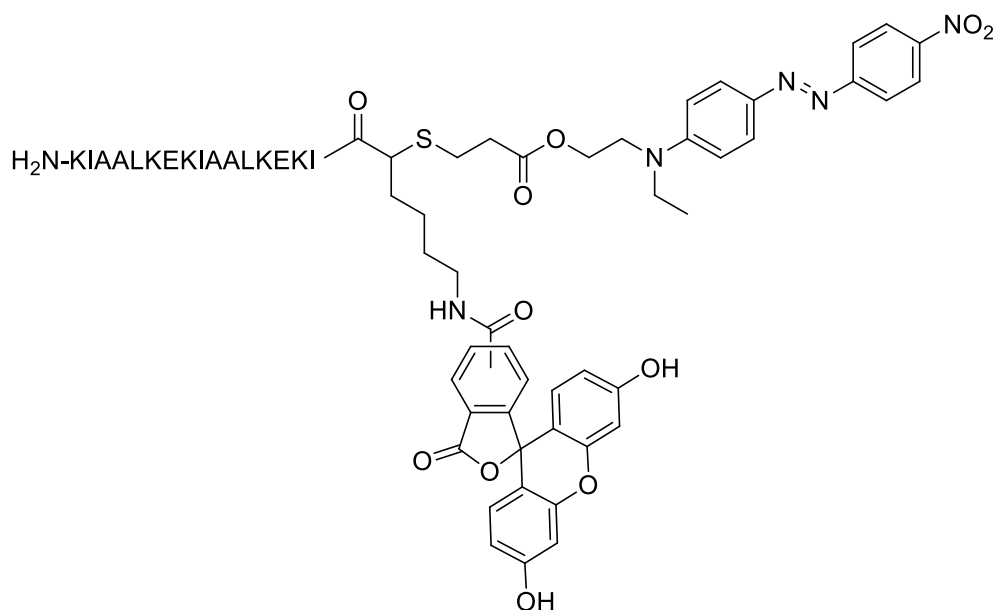


Abbildung 87: **A)** UPLC: $t_R = 1.25 \text{ min}$ (3% B \rightarrow 90% B in 2 min). **B)** MALDI-TOF-MS: $m/z = 2041.60$ ($\text{C}_{93}\text{H}_{171}\text{N}_{24}\text{O}_{24}\text{S}_1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 2041.57).

6.9.2.2 Peptid 109



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem Fmoc-Lys(Alloc)-OH vorbeladenes 4-Sulfamylbutyryl-(PhiPr)glutamyl-Glycin-Polystyrol beladenes MBHA Harz (21.7 mg, 0.46 mmol/mg) mit Hilfe der selbstreinigenden Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Die Verlängerung der Peptidsequenz erfolgte am Peptidsynthesizer. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 1.71 μmol (57%).

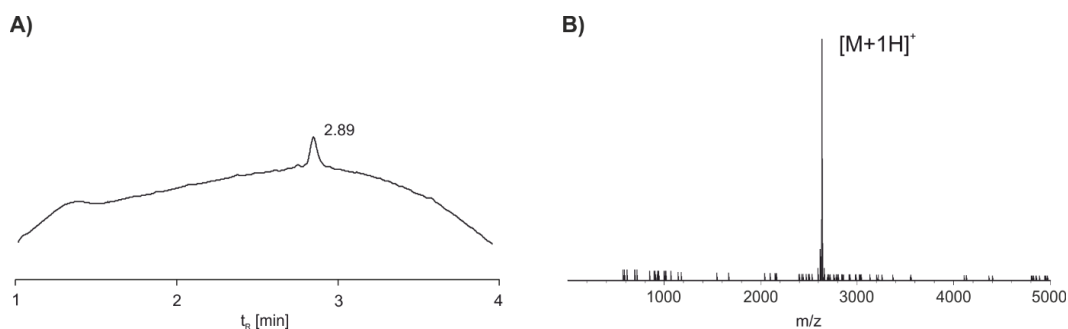


Abbildung 88: **A)** UPLC: $t_R = 2.89$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** MALDI-TOF-MS: $m/z=2637.6$ ($\text{C}_{128}\text{H}_{194}\text{N}_{27}\text{O}_{31}\text{S}_1$ $[M+H]^+$, calcd: 2639.2).

6.9.2.3 Peptid 107



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 2.1 μmol (70%).

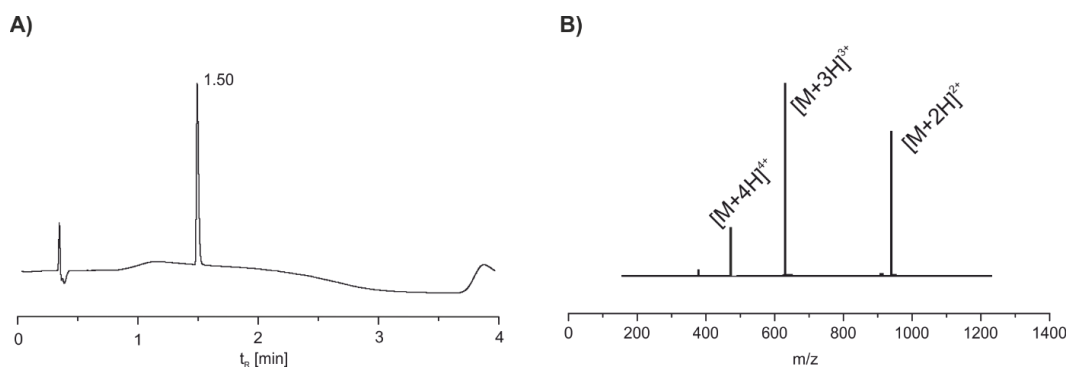
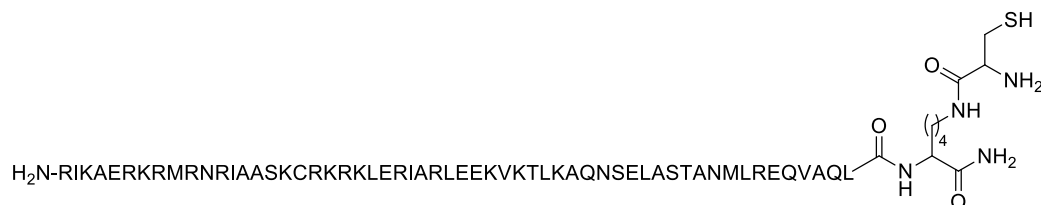


Abbildung 89: **A)** UPLC: $t_R = 1.50 \text{ min}$ (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 1869.82 Da, m/z : $[M+4H]^{4+}$: 468.63; $[M+3H]^{3+}$: 624.20; $[M+2H]^{2+}$: 935.67 ($\text{C}_{85}\text{H}_{157}\text{N}_{23}\text{O}_{21}\text{S}_1$, 1869.36 Da, berechnet: $[M+4H]^{4+}$: 468.35; $[M+3H]^{3+}$: 624.13; $[M+2H]^{2+}$: 935.69.).

6.9.3 Peptide aus Abschnitt 4.4

6.9.3.1 Peptid JunCTCys



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μ mol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Dabei wurde das Harz mit Fmoc-Lys(Mmt)-OH vorbeladen. Die Mmt-Schutzgruppe wurde mit 1% TFA in CH₂Cl₂ entschützt. Das mit CH₂Cl₂ gewaschene Harz wurde nach den Bedingungen in Abschnitt 6.2.1 mit Fmoc-Cys(MeBzl)-OH behandelt. Die Verlängerung des Peptids erfolgte nun nach den Bedingungen in Abschnitt 6.3. Aliquote von ~ 3 μ M wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 0.36 μ mol (12%).

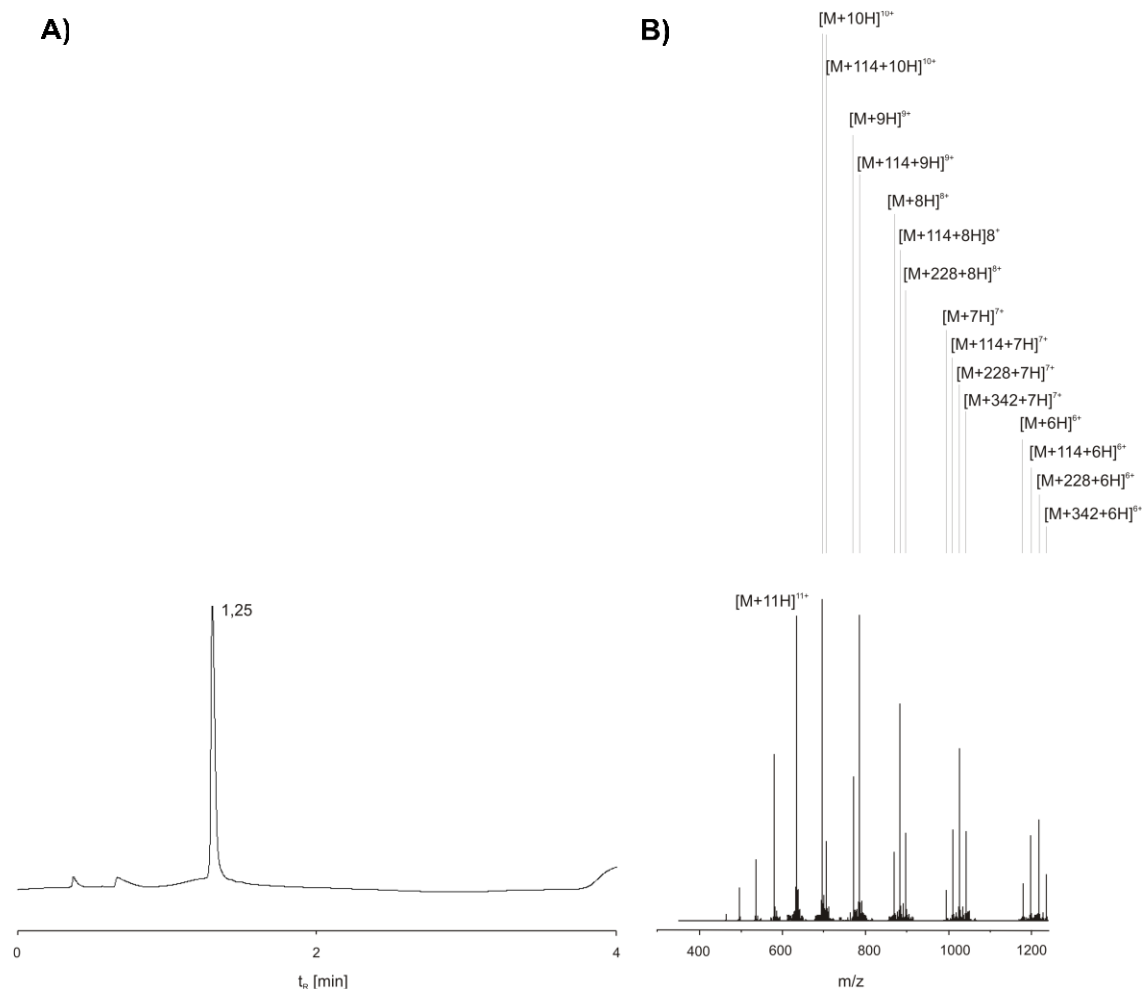
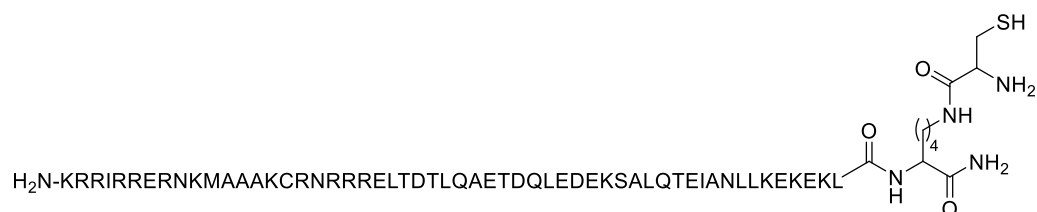


Abbildung 90: **A)** UPLC: $t_R = 1.25$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 6950 Da, m/z: $[M+11H]^{11+}$: 633.13; $[M+10H]^{10+}$: 695.7; $[M+9H]^{9+}$: 772.9, $[M+8H]^{8+}$: 869.5, $[M+7H]^{7+}$: 994.5, $[M+6H]^{6+}$: 1159.6 ($C_{292}H_{529}N_{105}O_{82}S_4$, 6946 Da, berechnet). Bei den zusätzlichen Peaks handelt es sich um einfache bis vielfache TFA-Addukte: 114 Da.

6.9.3.2 Peptid FosCTCys



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 µmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Dabei wurde das Harz mit Fmoc-Lys(Mmt)-OH vorbeladen. Die Mmt-Schutzgruppe wurde mit 1% TFA in CH₂Cl₂ entschützt. Das mit CH₂Cl₂ gewaschene Harz wurde nach den Bedingungen in Abschnitt 6.2.1 mit Fmoc-Cys(MeBzl)-OH behandelt. Die Verlängerung des Peptids erfolgte nun nach den Bedingungen in Abschnitt 6.3. Aliquote von ~ 3 µM wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 0.48 µmol (16%).

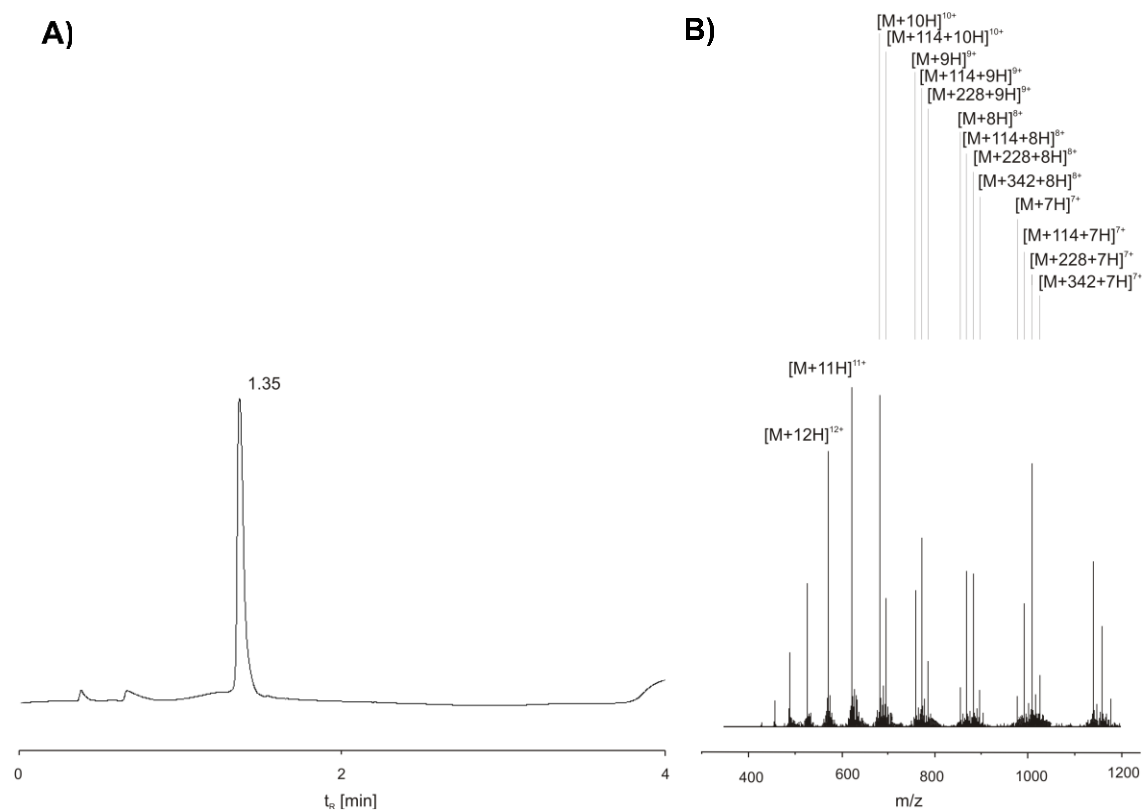
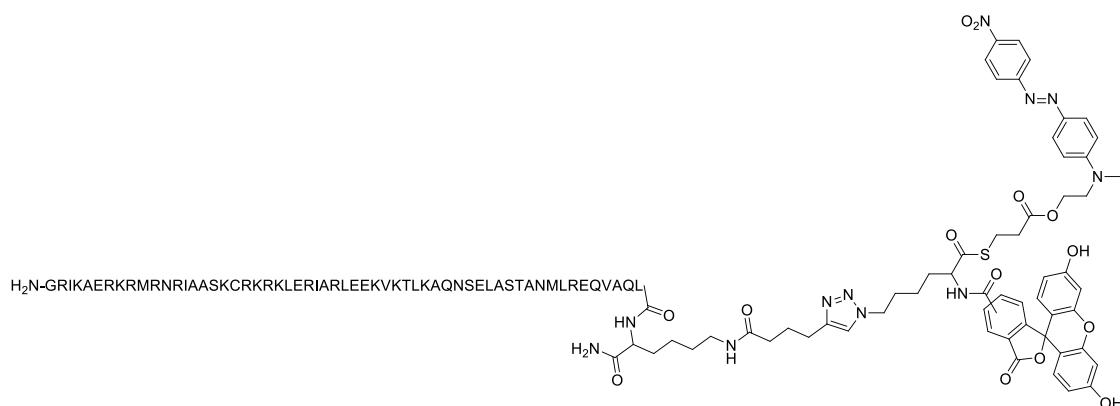


Abbildung 91 A) UPLC: $t_R = 1.29$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 6828 Da, m/z : $[M+12H]^{12+}$: 570.09; $[M+11H]^{11+}$: 621.78; $[M+10H]^{10+}$: 683.8, $[M+9H]^{9+}$: 760.6, $[M+8H]^{8+}$: 854.4, $[M+7H]^{7+}$: 976.2 ($C_{283}H_{501}N_{99}O_{90}S_3$, 6822 Da, berechnet). Bei den zusätzlichen Peaks handelt es sich um einfache bis vielfache TFA-Addukte: 114 Da.

6.9.3.3 Peptid JunCTTE



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Die Synthese wurde nach Abschnitt 6.5 modifiziert. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 150 nmol (5%).

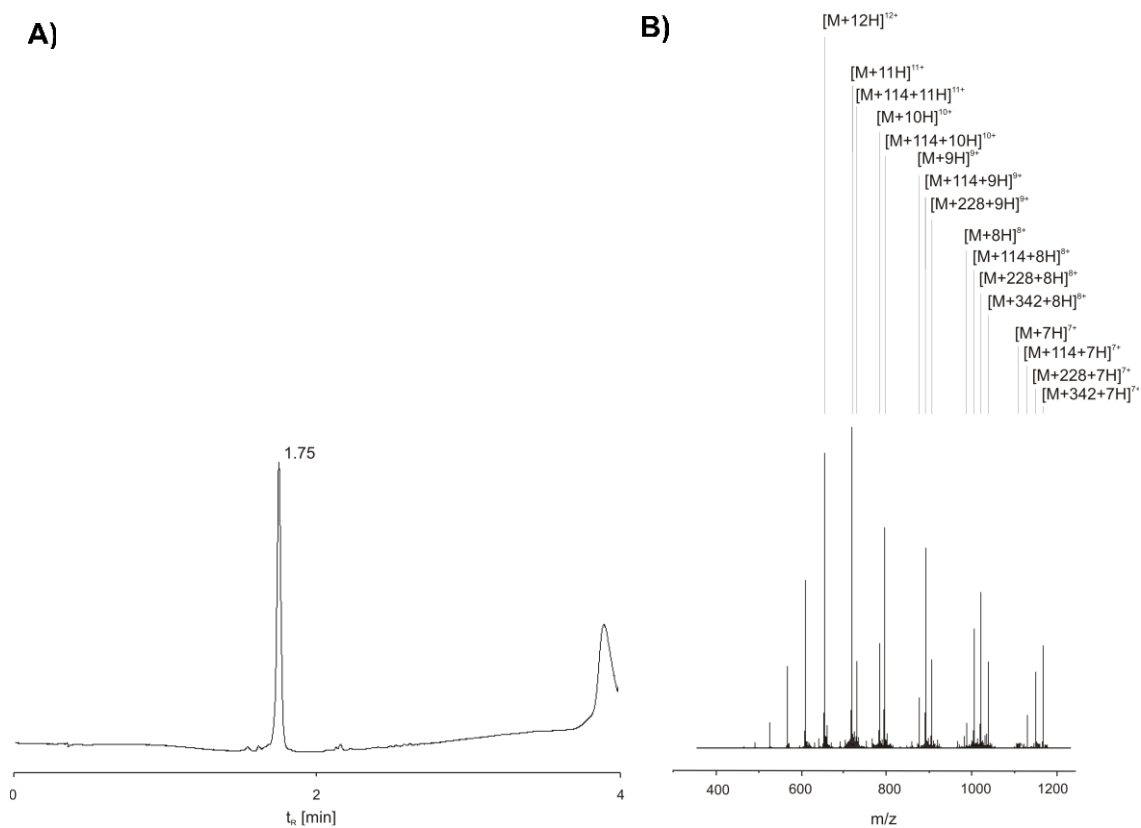
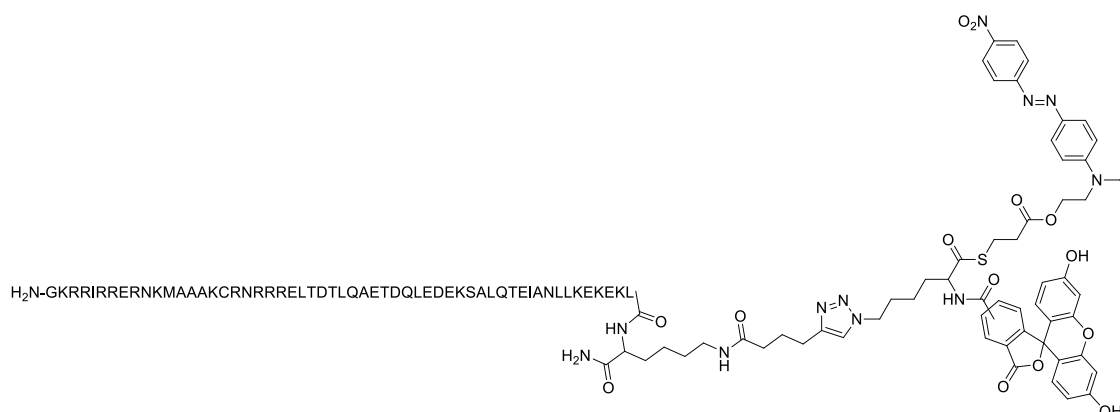


Abbildung 92: **A)** UPLC: $t_R = 1.75$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 7915 Da, m/z : $[M+12H]^{12+}$: 660.8; $[M+11H]^{11+}$: 721; $[M+10H]^{10+}$: 793.0, $[M+9H]^{9+}$: 880.4, $[M+8H]^{8+}$: 990.5, $[M+7H]^{7+}$: 1131.7 ($C_{343}H_{575}N_{113}O_{94}S_4$, 7909 Da, berechnet). Bei den zusätzlichen Peaks handelt es sich um einfache bis vielfache TFA-Addukte: 114 Da.

6.9.3.4 Peptid FosCTTE



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μ mol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Die Synthese wurde nach Abschnitt 6.5 modifiziert. Aliquote von $\sim 3 \mu$ M wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 90 nmol (3%).

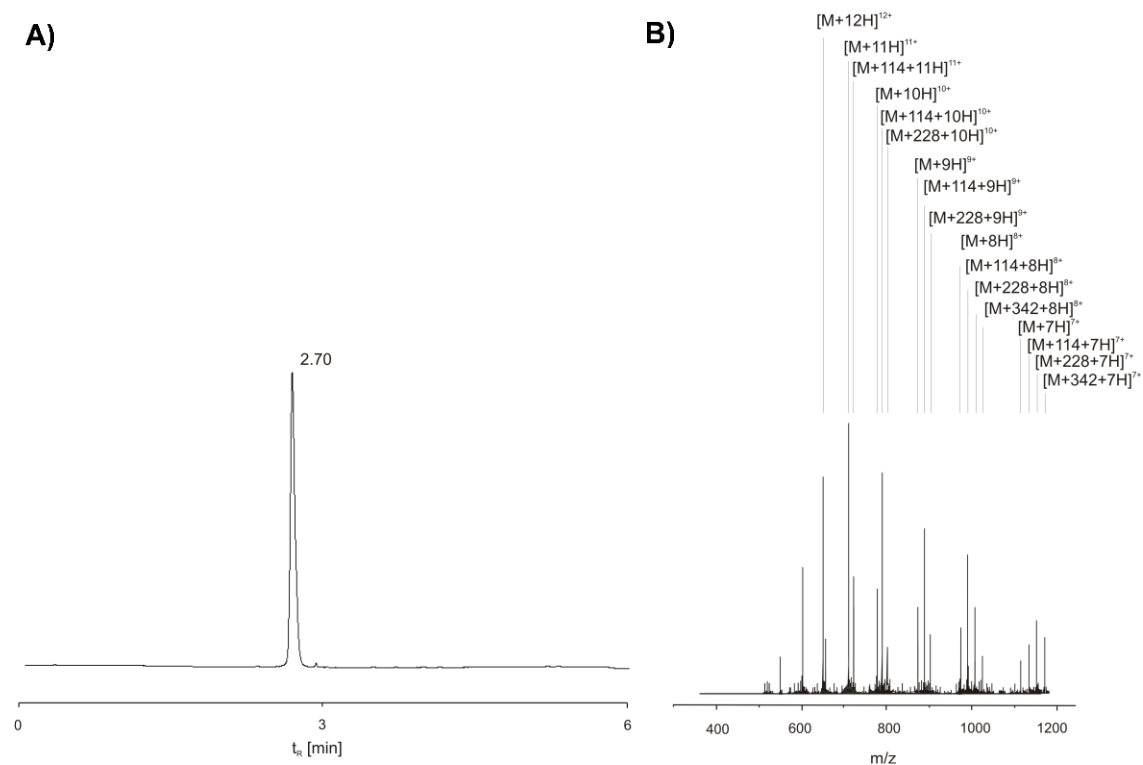
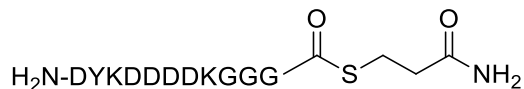


Abbildung 93: A) UPLC: $t_R = 2.70$ min (3% B \rightarrow 90% B in 6 min). **B)** ESI-MS: 7792 Da, m/z : $[M+12H]^{12+}$: 650.3; $[M+11H]^{11+}$: 709.3; $[M+10H]^{10+}$: 780.8, $[M+9H]^{9+}$: 867.1, $[M+8H]^{8+}$: 975.1., $[M+7H]^{7+}$: 1114.1 ($C_{334}H_{547}N_{107}O_{102}S_3$, 7785 Da, berechnet). Bei den zusätzlichen Peaks handelt es sich um einfache bis vielfache TFA-Addukte: 114 Da.

6.9.4 Peptide aus Abschnitt 4.5

6.9.4.1 Peptid 124



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 10 μmol Maßstab auf einem Mercaptopropionsäure beladenes MBHA Harz (21.7 mg, 0.46 mmol/mg) mit Hilfe der manuellen Festphasenpeptidsynthese nach Boc-Protokoll durchgeführt (modifiziert nach Abbildung 62). Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 0.63 μmol (21%).

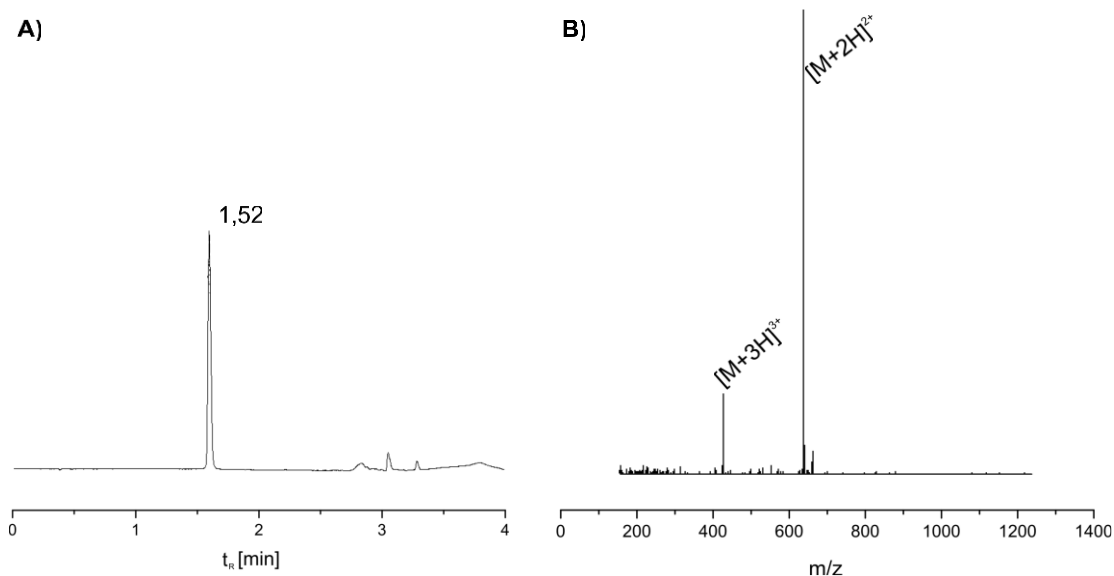


Abbildung 94: **A)** UPLC: $t_R = 1.57 \text{ min}$ (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 1300.4 Da, m/z : $[M+3H]^{3+}$: 434.5; $[M+2H]^{2+}$: 651.1 ($\text{C}_{52}\text{H}_{81}\text{N}_{15}\text{O}_{22}\text{S}$, 1299.5 Da).

6.9.4.2 Peptid 125



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 1.25 μmol (25%).

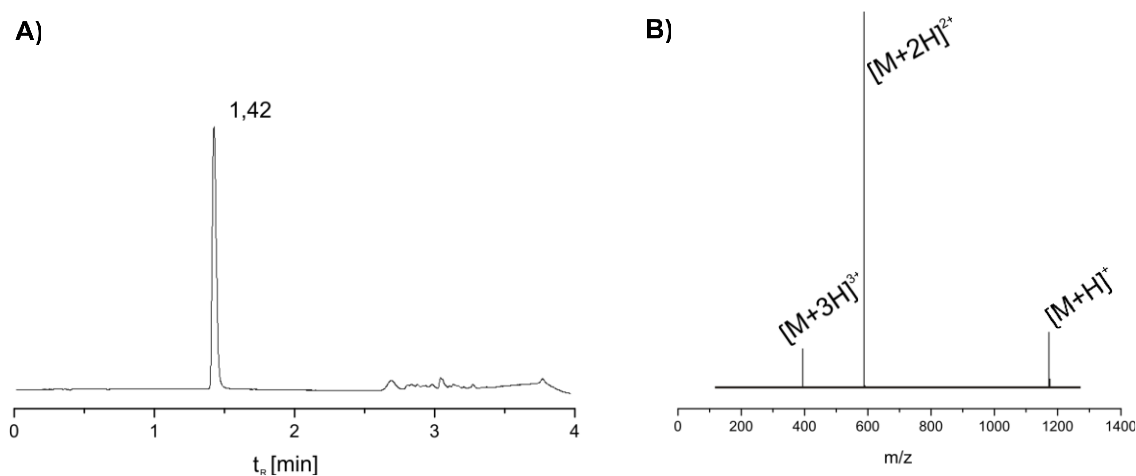
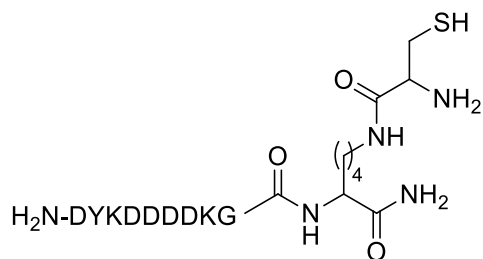


Abbildung 95: UPLC: $t_R = 1.42 \text{ min}$ (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). ESI-MS: 1171.9 Da, m/z : $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$: 391.6; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$: 587.1; $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1172.8 ($\text{C}_{46}\text{H}_{69}\text{N}_{13}\text{O}_{21}\text{S}$, 1171.4 Da)

6.9.4.3 Peptid 126



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Dabei wurde das Harz mit Fmoc-Lys(Mmt)-OH vorbeladen. Die Mmt-Schutzgruppe wurde mit 1% TFA in CH_2Cl_2 entschützt. Das mit CH_2Cl_2 gewaschene Harz wurde nach den Bedingungen in Abschnitt 6.2.1 mit Fmoc-Cys(MeBzl)-OH behandelt. Die Verlängerung des Peptids erfolgte nun nach den Bedingungen in Abschnitt 6.3. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 0.95 μmol (19%).

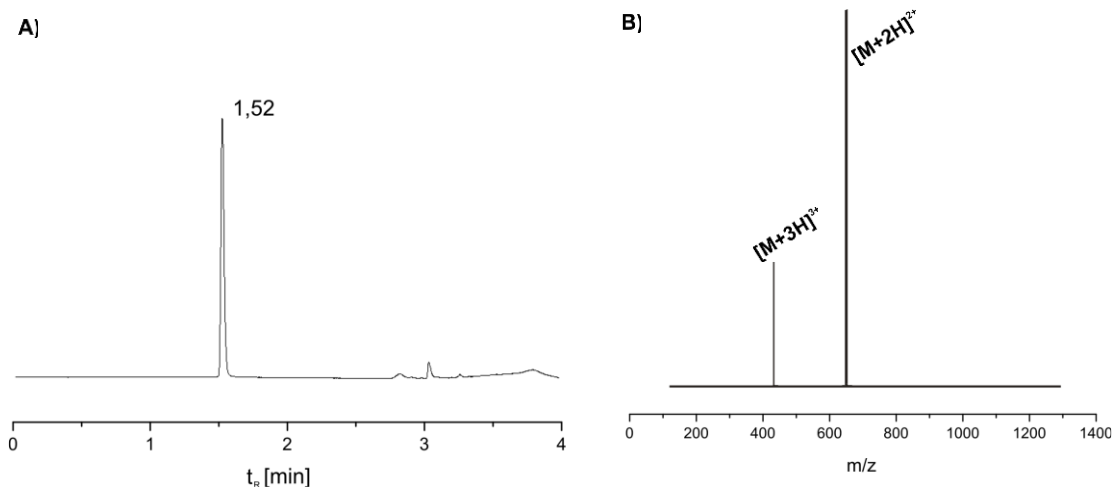
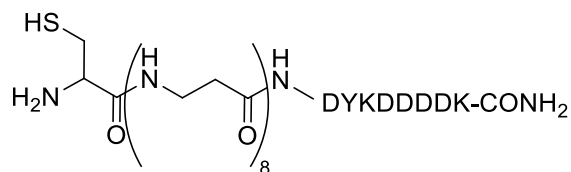


Abbildung 96: **A)** UPLC: $t_R = 1.52$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 1270.9 Da, m/z : $[M+3H]^{3+}$: 424.8; $[M+2H]^{2+}$: 636.5 ($\text{C}_{50}\text{H}_{74}\text{N}_{14}\text{O}_{23}\text{S}$, 1720.5 Da)

6.9.4.4 Peptid 131a



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 1.59 μmol (53%).

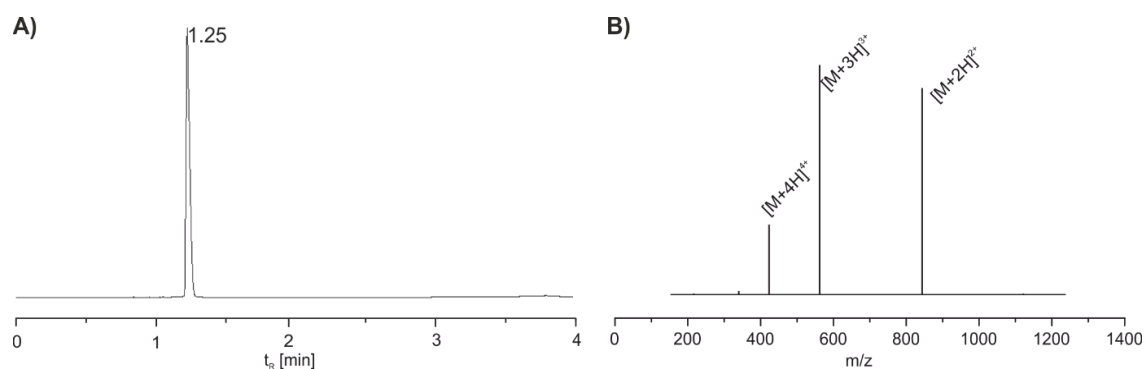
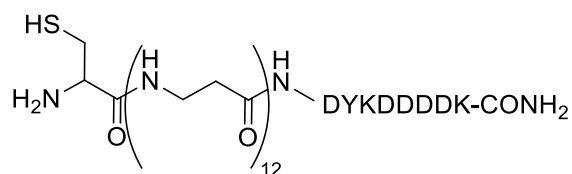


Abbildung 97: A) UPLC: $t_R = 1.13 \text{ min}$ (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). B) ESI-MS: 1682.57 Da, m/z : $[M+4H]^{4+}$: 421.69; $[M+3H]^{3+}$: 561.87; $[M+2H]^{2+}$: 842.42 ($\text{C}_{68}\text{H}_{106}\text{N}_{20}\text{O}_{28}\text{S}$, 1682.72 Da, calcd: $[M+4H]^{4+}$: 421.95; $[M+3H]^{3+}$: 562.26; $[M+2H]^{2+}$: 842.88

6.9.4.5 Peptid 131b



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 1.14 μmol (38%).

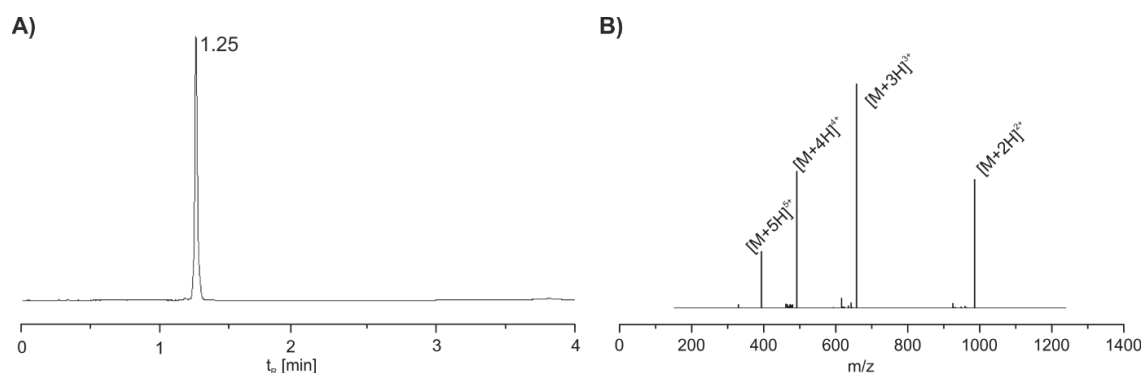


Abbildung 98: **A)** UPLC: $t_R = 1.25$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 1966.69 Da, m/z : $[M+5H]^{5+}$: 394.38; $[M+4H]^{4+}$: 492.69; $[M+3H]^{3+}$: 656.58; $[M+2H]^{2+}$: 984.27 ($C_{80}H_{126}N_{24}O_{32}S$, 1966.87 Da, calcd: $[M+5H]^{5+}$: 394.40; $[M+4H]^{4+}$: 492.72; $[M+3H]^{3+}$: 656.63; $[M+2H]^{2+}$: 984.44).

6.9.4.6 Peptid 132



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 1.89 μmol (63%).

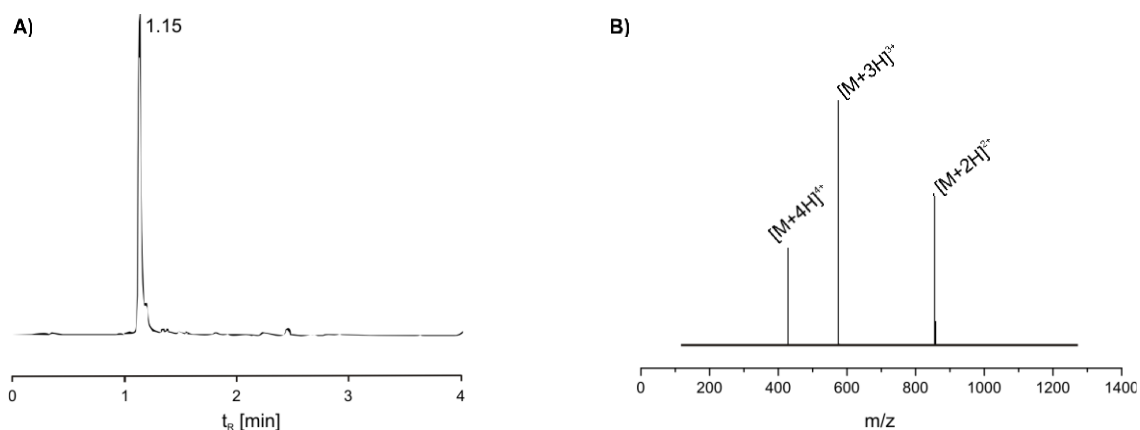
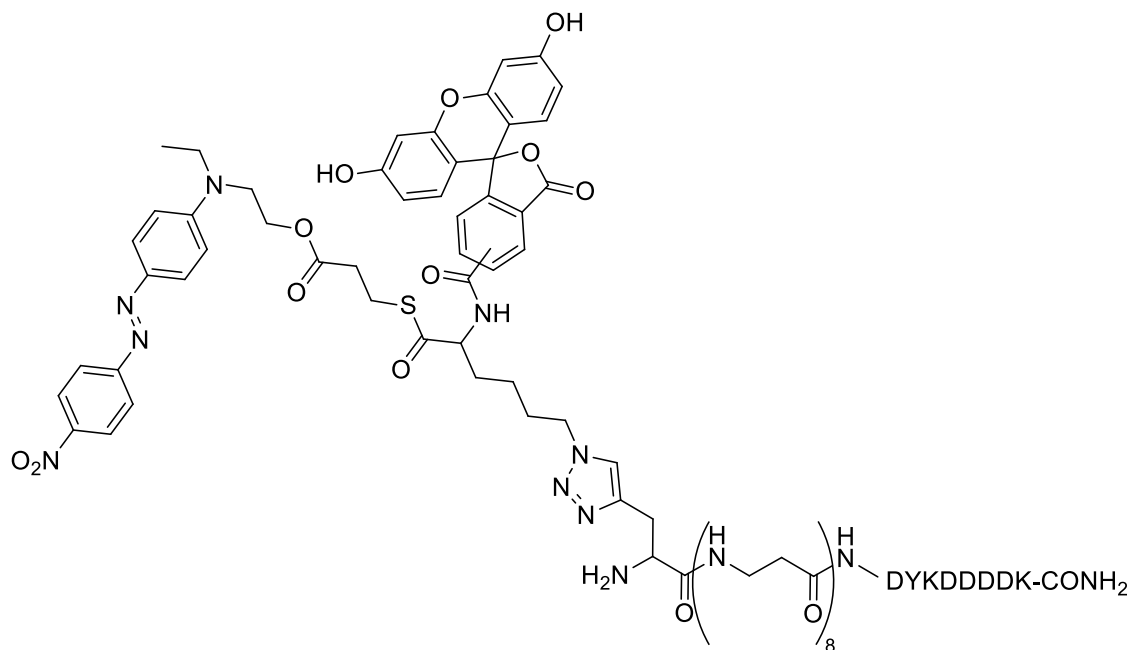


Abbildung 99: **A)** UPLC: $t_R = 1.15$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 1718.65 Da, m/z : $[M+4H]^{4+}$: 430.39; $[M+3H]^{3+}$: 573.61; $[M+2H]^{2+}$: 859.79 ($\text{C}_{65}\text{H}_{99}\text{N}_{21}\text{O}_{32}\text{S}_1$, 1718.66 Da, calcd: $[M+4H]^{4+}$: 430.67; $[M+3H]^{3+}$: 573.90; $[M+2H]^{2+}$: 860.34).

6.9.4.7 Peptid 129a



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll bis zum letzten β -Alain durchgeführt. Anschließend wurde das Harz in fünf Teile aufgeteilt und 16 h mit 5 Äq **123** (0.025 M) und 5 Äq DIPEA in einer gesättigten CuI-Lösung behandelt. Die Abspaltung erfolgte wie in 6.2.1. Nach der präparativen HPLC-Aufreinigung wurden 3.5 μmol **129a** (Ausbeute 70%) erhalten.

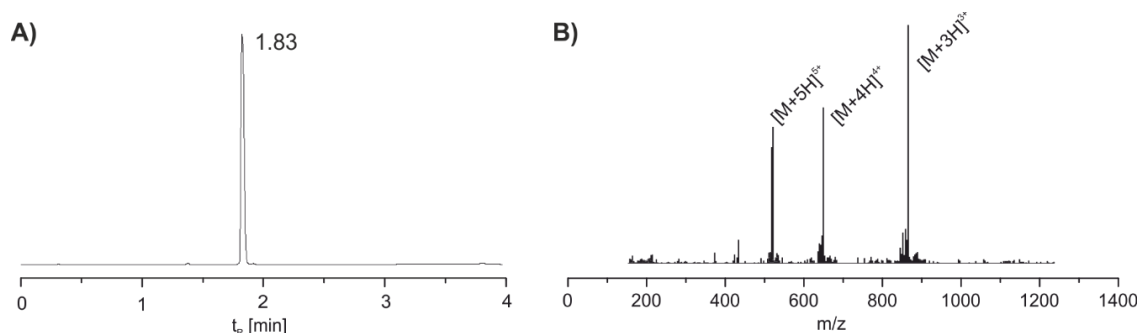
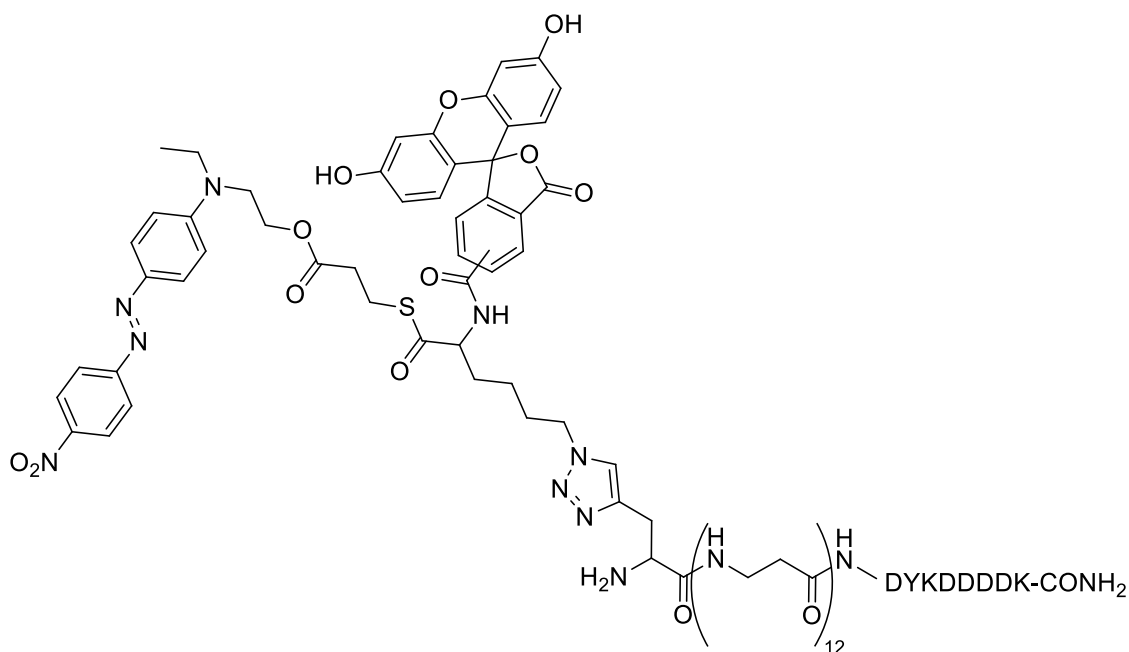


Abbildung 100: **A)** UPLC: $t_R = 1.83$ min (3% B \rightarrow 90% B in 2 min). **B)** ESI-MS: 2590.39 Da, m/z: $[M+5H]^{5+}$: 519.08; $[M+4H]^{4+}$: 648.64; $[M+3H]^{3+}$: 864.40 ($C_{116}H_{151}N_{29}O_{38}S$, 2590.05 Da, calcd: $[M+5H]^{5+}$: 510.01; $[M+4H]^{4+}$: 648.51; $[M+3H]^{3+}$: 864.35).

6.9.4.8 Peptid 129b



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll bis zum letzten β -Alain durchgeführt. Propargylglycine wurde nach den Bedingungen in 6.2.1 gekuppelt. Anschließend wurde das Harz in fünf Teile aufgeteilt und 16 h mit 5 Äq **123** (0.025 M) und 5 Äq DIPEA in einer gesättigten CuI-Lösung behandelt. Die Abspaltung erfolge wie in 6.2.1. Nach der präparativen HPLC-Aufreinigung wurden 3.25 μmol **129a** (Ausbeute 65%) erhalten.

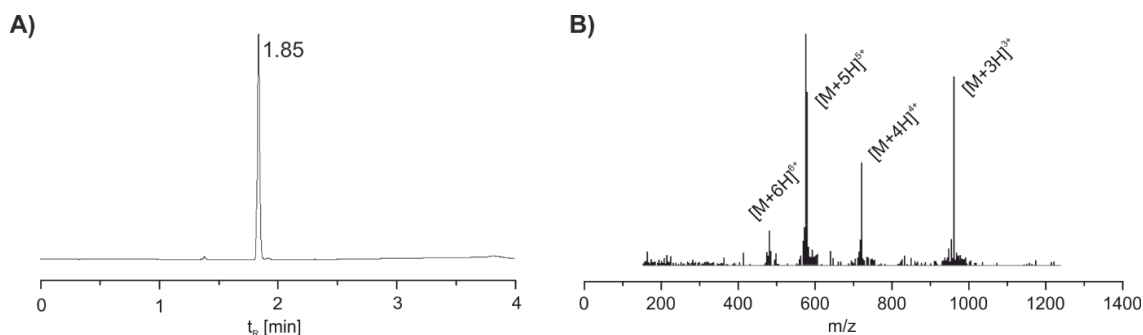
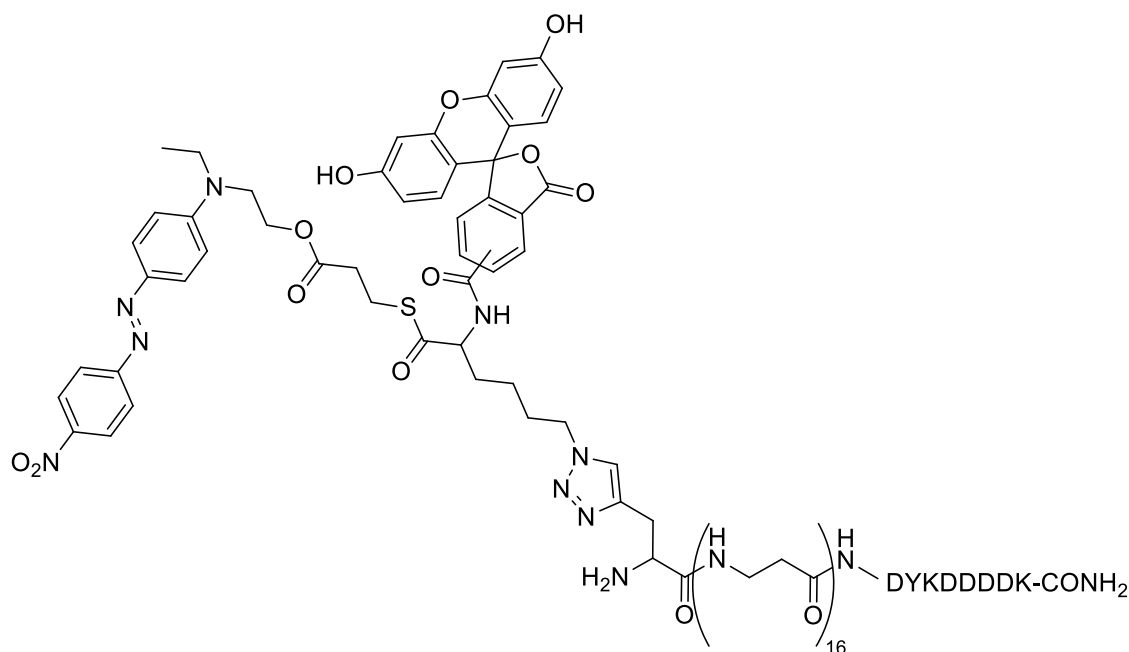


Abbildung 101: **A)** UPLC: $t_R = 1.85$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 2876.05 Da, m/z: $[M+6H]^{6+}$: 480.42; $[M+5H]^{5+}$: 576.22; $[M+4H]^{4+}$: 720.06; $[M+3H]^{3+}$: 959.49 ($C_{128}H_{171}N_{33}O_{42}S$, 2875.00 Da, calcd: $[M+6H]^{6+}$: 480.17; $[M+5H]^{5+}$: 576.01; $[M+4H]^{4+}$: 719.76; $[M+3H]^{3+}$: 959.34).

6.9.4.9 Peptid 129c



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll bis zum letzten β -Alain durchgeführt. Propargylglycin wurde nach den Bedingungen in 6.2.1 gekuppelt. Anschließend wurde das Harz in fünf Teile aufgeteilt und 16 h mit 5 Äq **123** (0.025 M) und 5 Äq DIPEA in einer gesättigten CuI-Lösung behandelt. Die Abspaltung erfolge wie in 6.2.1. Nach der präparativen HPLC-Aufreinigung wurden 2.95 μmol **129a** (Ausbeute 59%) erhalten.

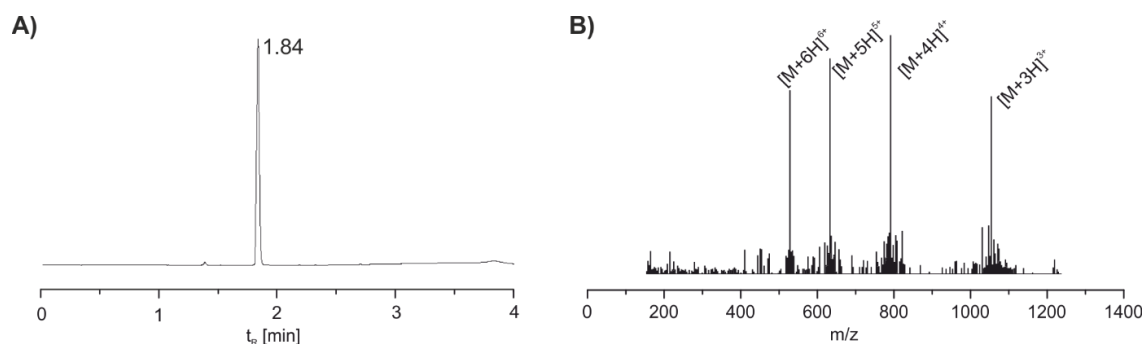
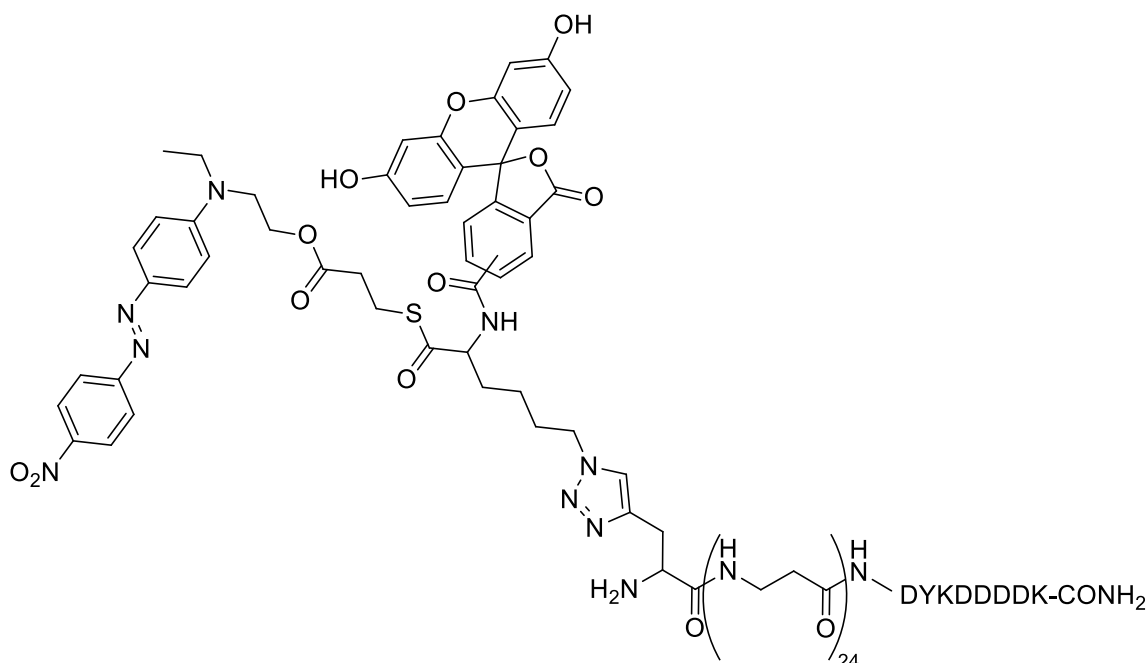


Abbildung 102: **A)** UPLC: $t_R = 1.84$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 3159.64 Da, m/z: $[M+6H]^{6+}$: 527.67; $[M+5H]^{5+}$: 632.96; $[M+4H]^{4+}$: 790.98; $[M+3H]^{3+}$: 1053.99 ($C_{140}H_{191}N_{37}O_{46}S$, 3160.31 Da, calcd: $[M+6H]^{6+}$: 527.73; $[M+5H]^{5+}$: 633.07; $[M+4H]^{4+}$: 791.08; $[M+3H]^{3+}$: 1054.44).

6.9.4.10 Peptid 129d



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll bis zum letzten β -Alain durchgeführt. Propargylglycin wurde nach den Bedingungen in 6.2.1 gekuppelt. Anschließend wurde das Harz in fünf Teile aufgeteilt und 16 h mit 5 Äq **123** (0.025 M) und 5 Äq DIPEA in einer gesättigten CuI-Lösung behandelt. Die Abspaltung erfolge wie in 6.2.1. Nach der präparativen HPLC-Aufreinigung wurden 1.95 μmol **129a** (Ausbeute 39%) erhalten.

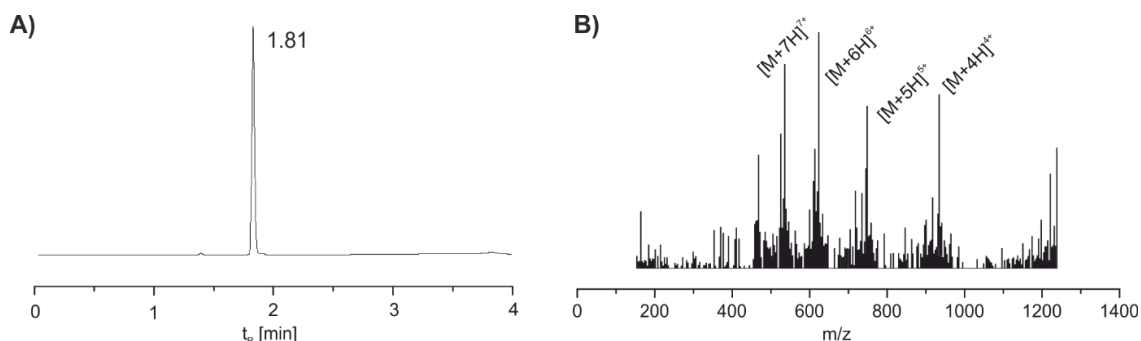
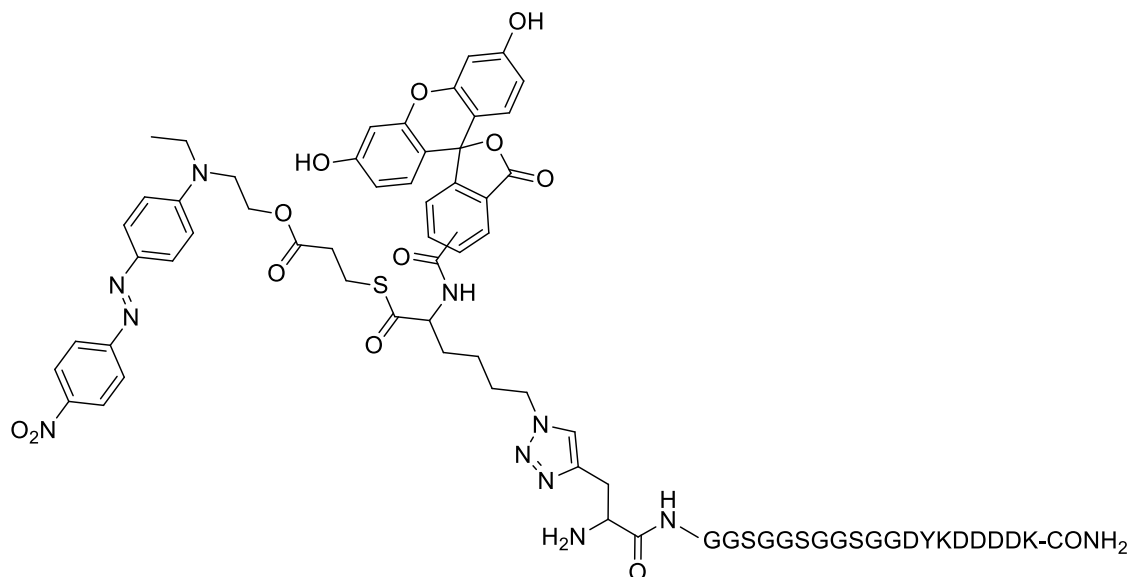
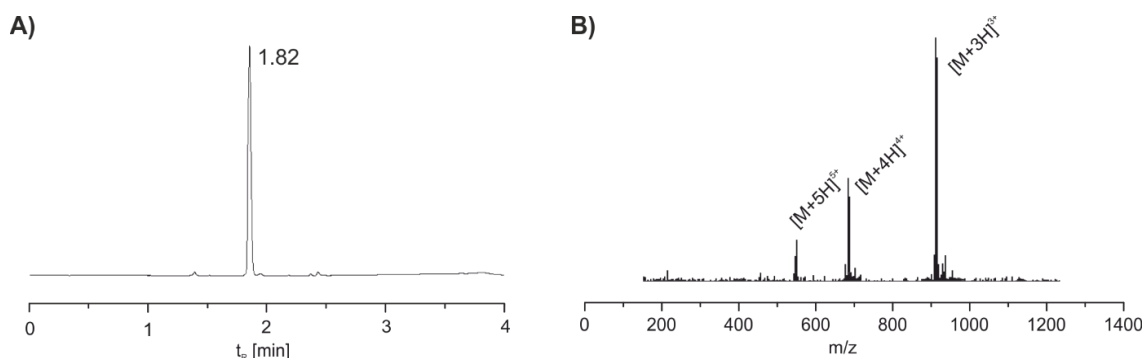


Abbildung 103: **A)** UPLC: $t_R = 1.81$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 3730.02 Da, m/z: $[M+7H]^{7+}$: 533.87; $[M+6H]^{6+}$: 622.77; $[M+5H]^{5+}$: 747.13; $[M+4H]^{4+}$: 933.22 ($C_{164}H_{231}N_{45}O_{54}S$, 3728.93 Da, calcd: $[M+7H]^{7+}$: 533.71; $[M+6H]^{6+}$: 622.50; $[M+5H]^{5+}$: 746.79; $[M+4H]^{4+}$: 933.24).

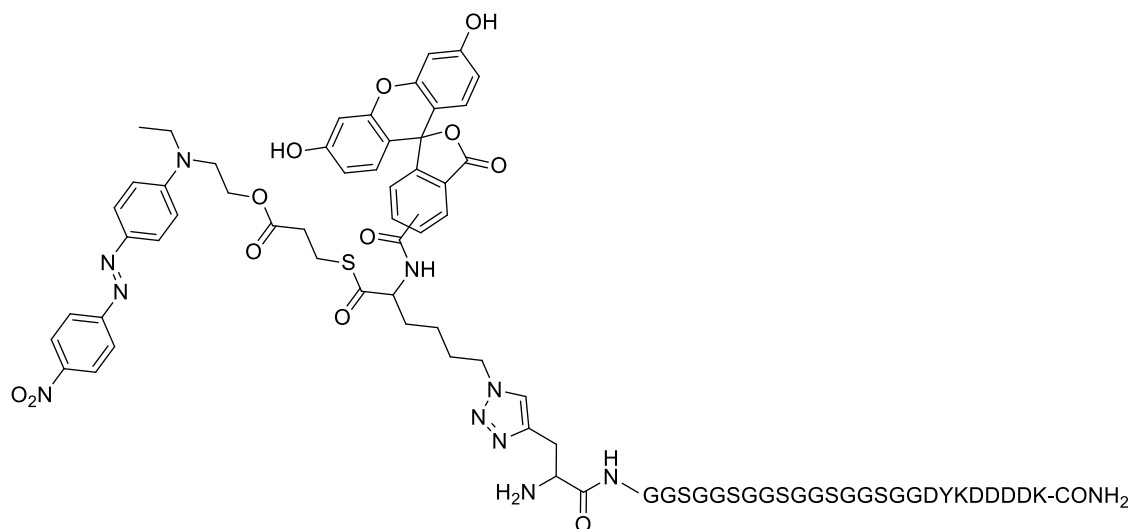
6.9.4.11 Peptid 130a



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll bis zum letzten Glycin durchgeführt. Propargylglycin wurde nach den Bedingungen in 6.2.1 gekuppelt. Anschließend wurde das Harz in fünf Teile aufgeteilt und 16 h mit 5 \AA q **123** (0.025 M) und 5 \AA q DIPEA in einer gesättigten CuI-Lösung behandelt. Die Abspaltung erfolge wie in 6.2.1. Nach der präparativen HPLC-Aufreinigung wurden 3.95 μmol **129a** (Ausbeute 79%) erhalten.



6.9.4.12 Peptid 130b



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 µmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll bis zum letzten Glycin durchgeführt. Propargylglycin wurde nach den Bedingungen in 6.2.1 gekuppelt. Anschließend wurde das Harz in fünf Teile aufgeteilt und 16 h mit 5 Äq **123** (0.025 M) und 5 Äq DIPEA in einer gesättigten CuI-Lösung behandelt. Die Abspaltung erfolge wie in 6.2.1. Nach der präparativen HPLC-Aufreinigung wurden 3.4 µmol **129a** (Ausbeute 68%) erhalten.

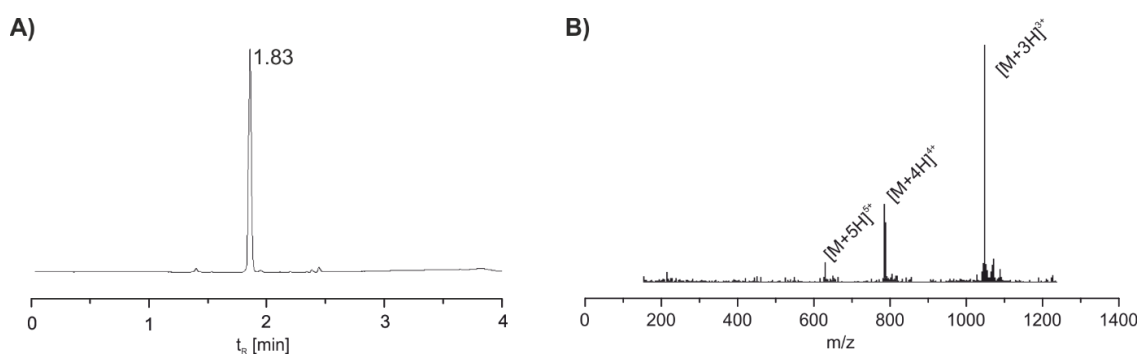
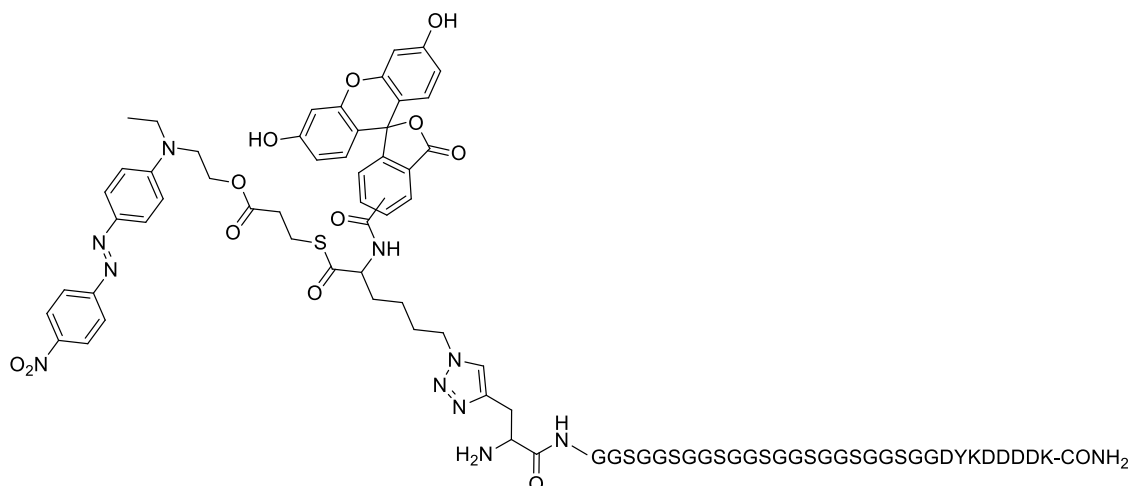


Abbildung 105: **A)** UPLC: $t_R = 1.81$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 3140.94 Da, m/z: $[M+5H]^{5+}$: 629.26; $[M+4H]^{4+}$: 786.79; $[M+3H]^{3+}$: 1047.15 ($C_{131}H_{172}N_{38}O_{52}S$, 3141.17 Da, calcd: $[M+5H]^{5+}$: 629.24; $[M+4H]^{4+}$: 786.30; $[M+3H]^{3+}$: 1048.06).

6.9.4.13 Peptid 130c



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll bis zum letzten Glycin durchgeführt. Propargylglycine wurde nach den Bedingungen in 6.2.1 gekuppelt. Anschließend wurde das Harz in fünf Teile aufgeteilt und 16 h mit 5 Äq **123** (0.025 M) und 5 Äq DIPEA in einer gesättigten CuI-Lösung behandelt. Die Abspaltung erfolge wie in 6.2.1. Nach der präparativen HPLC-Aufreinigung wurden 3 μmol **129a** (Ausbeute 60%) erhalten.

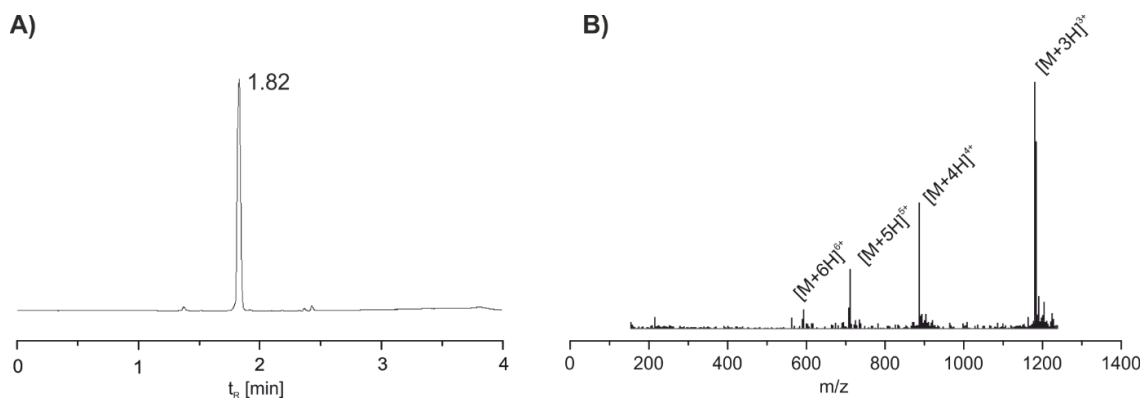
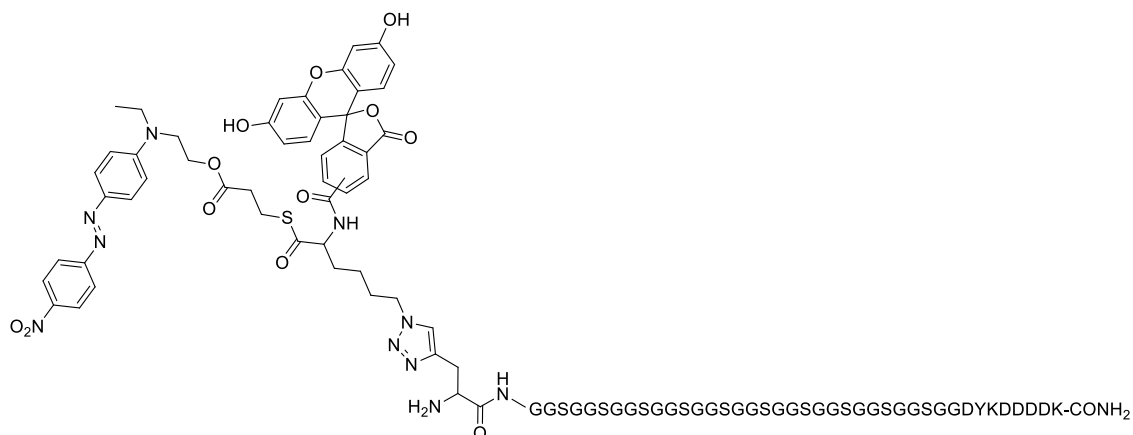


Abbildung 106: A) UPLC: $t_R = 1.81$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 3541.60 Da, m/z: $[M+6H]^{6+}$: 591.31; $[M+5H]^{5+}$: 709.28; $[M+4H]^{4+}$: 886.48; $[M+3H]^{3+}$: 1181.45 ($C_{145}H_{192}N_{44}O_{60}S$, 3728.93 Da, calcd: $[M+6H]^{6+}$: 591.31; $[M+5H]^{5+}$: 709.27; $[M+4H]^{4+}$: 886.33; $[M+3H]^{3+}$: 1181.44

6.9.4.14 Peptid 130d



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 µmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll bis zum letzten Glycin durchgeführt. Propargylglycin wurde nach den Bedingungen in 6.2.1 gekuppelt. Anschließend wurde das Harz in fünf Teile aufgeteilt und 16 h mit 5 Äq **123** (0.025 M) und 5 Äq DIPEA in einer gesättigten CuI-Lösung behandelt. Die Abspaltung erfolge wie in 6.2.1. Nach der präparativen HPLC-Aufreinigung wurden 2.15 µmol **129a** (Ausbeute 43%) erhalten.

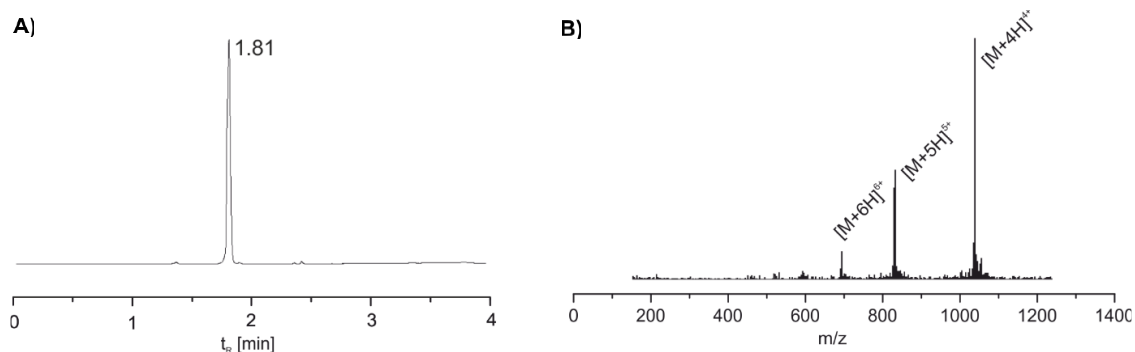
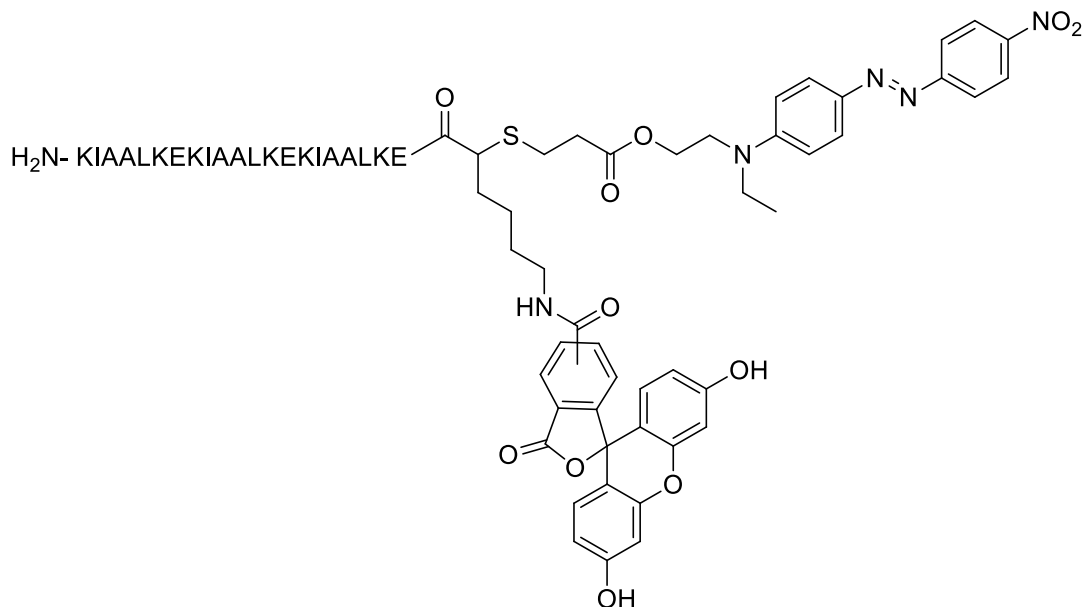


Abbildung 107: **A)** UPLC: $t_R = 1.81$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 4145.86 Da, m/z: [M+6H]⁶⁺: 692.20; [M+5H]⁵⁺: 830.14; [M+4H]⁴⁺: 1037.20 (C₁₆₆H₂₂₅N₅₃O₇₂S, 4144.53 Da, calcd: [M+6H]⁶⁺: 691.76; [M+5H]⁵⁺: 829.91; [M+4H]⁴⁺: 1037.14).

6.9.5 Peptide aus Abschnitt 4.6

6.9.5.1 Peptid 134a



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem Fmoc-Lys(Alloc)-OH vorbeladenes 4-Sulfamylbutyryl-(PhiPr)glutamyl-Glycin-Polystyrol beladenes MBHA Harz (35.7 mg, 0.7 mmol/mg) mit Hilfe der selbstreinigenden Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Die Verlängerung der Peptidsequenz erfolgte am Peptidsynthesizer. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 930 nmol (31%).

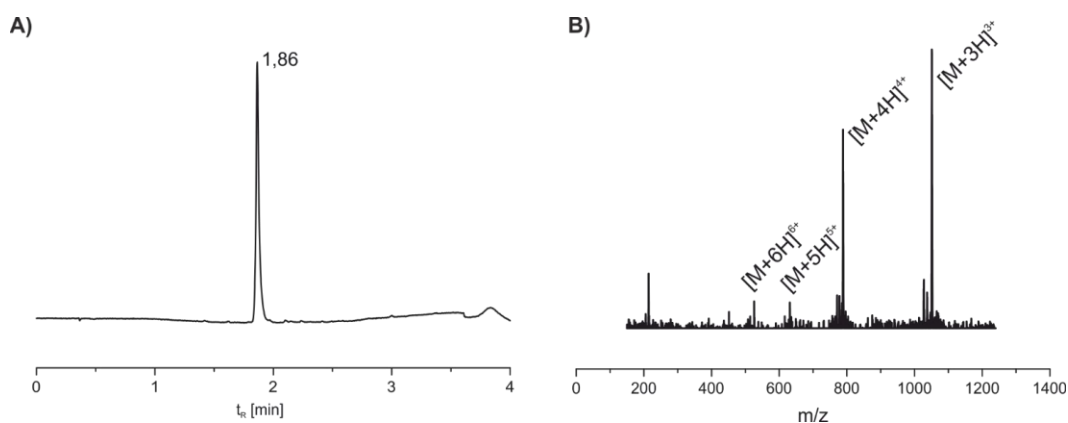
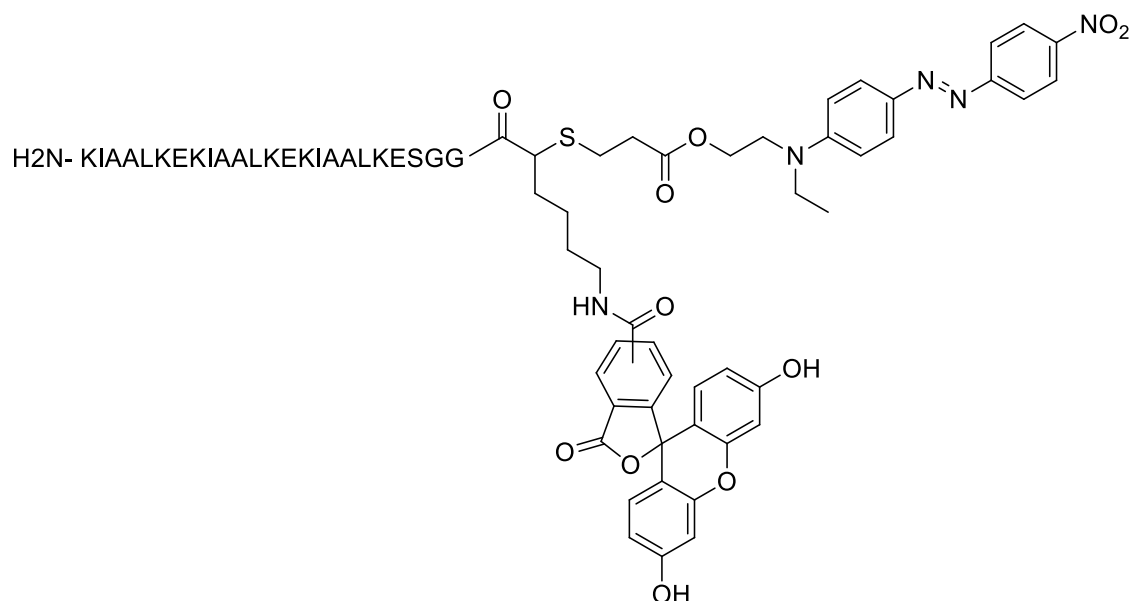


Abbildung 108: UPLC: $t_R = 1.86 \text{ min}$ (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). ESI-MS: 3150.79 Da, m/z: $[M+6H]^{6+}$: 526.10; $[M+5H]^{5+}$: 631.27; $[M+4H]^{4+}$: 788.59; $[M+3H]^{3+}$: 1051.28 ($C_{151}H_{233}N_{33}O_{38}S_1$, 3150.73 Da, berechnet: $[M+6H]^{6+}$: 526.12; $[M+5H]^{5+}$: 631.15; $[M+4H]^{4+}$: 788.68; $[M+3H]^{3+}$: 1051.24).

6.9.5.2 Peptid 134b



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem Fmoc-Lys(Alloc)-OH vorbeladenes 4-Sulfamylbutyryl-(PhiPr)glutamyl-Glycin-Polystyrol beladenes MBHA Harz (35.7 mg, 0.7 mmol/mg) mit Hilfe der selbstreinigenden Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Die Verlängerung der Peptidsequenz erfolgte am Peptidsynthesizer. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 879 nmol (30%).

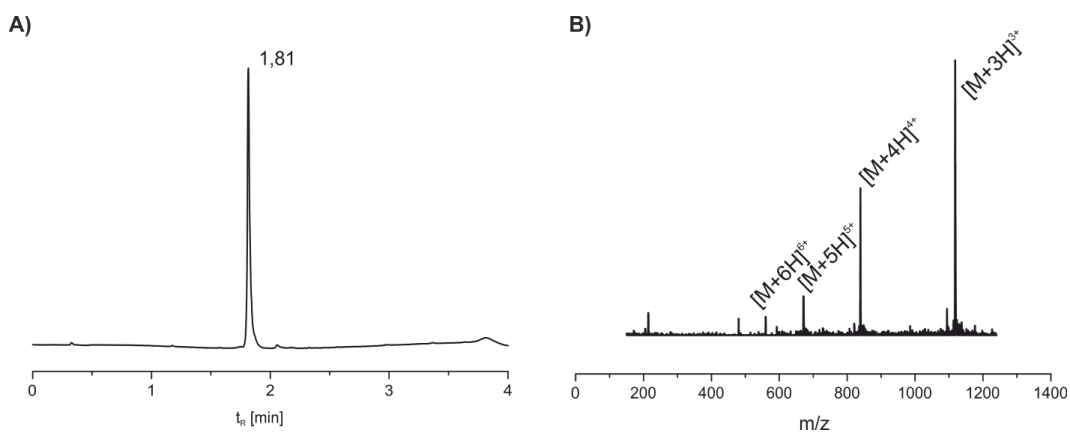
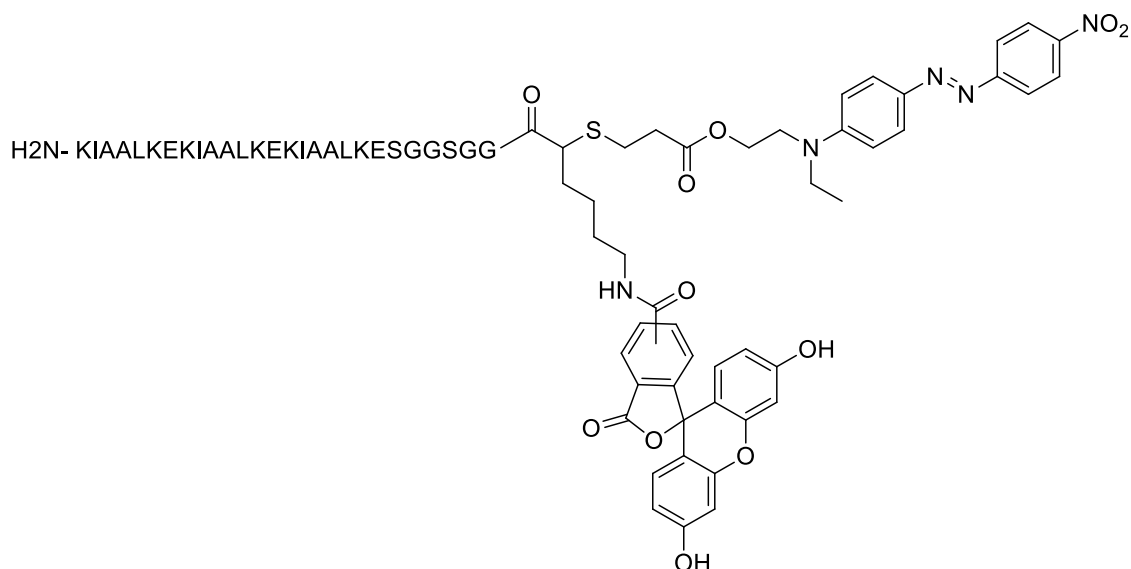


Abbildung 109: UPLC: $t_R = 1.81 \text{ min}$ (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). ESI-MS: 3352.38 Da, m/z: $[M+5H]^{5+}$: 671.55; $[M+4H]^{4+}$: 839.07; $[M+3H]^{3+}$: 1118.37 ($C_{158}H_{244}N_{36}O_{42}S_1$, 3351.91 Da, berechnet: $[M+5H]^{5+}$: 671.38; $[M+4H]^{4+}$: 838.98 $[M+3H]^{3+}$: 1118.30).

6.9.5.3 Peptid 134c



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μ mol Maßstab auf einem Fmoc-Lys(Alloc)-OH vorbeladenes 4-Sulfamylbutyryl-(PhiPr)glutamyl-Glycin-Polystyrol beladenes MBHA Harz (35.7 mg, 0.7 mmol/mg) mit Hilfe der selbstreinigenden Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll durchgeführt. Die Verlängerung der Peptidsequenz erfolgte am Peptidsynthesizer. Aliquote von ~ 3 μ M wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 807 nmol (27%).

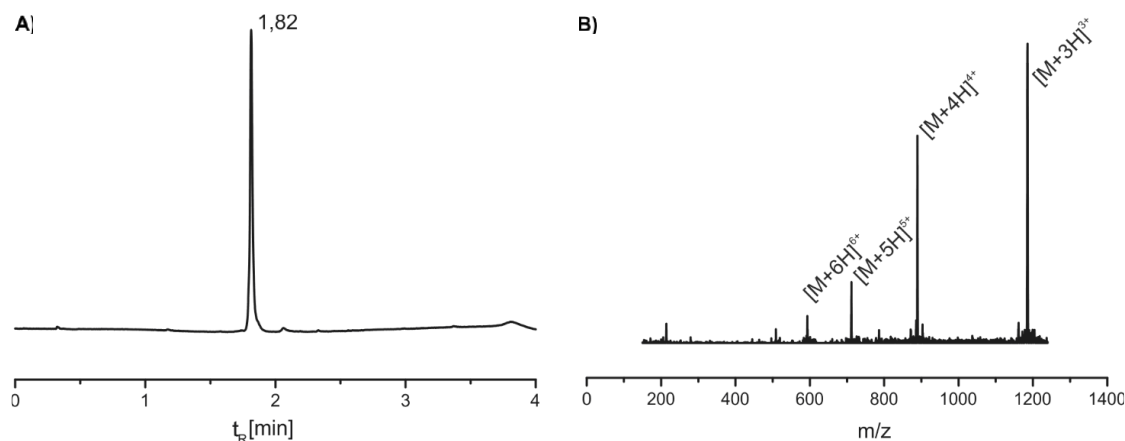


Abbildung 110: UPLC: $t_R = 1.82$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). ESI-MS: 3553.51 Da, m/z : $[M+6H]^{6+}$: 593.08; $[M+5H]^{5+}$: 711.93; $[M+4H]^{4+}$: 889.44; $[M+3H]^{3+}$: 1185.38 ($C_{165}H_{255}N_{39}O_{46}S_1$, 3553.09 Da, berechnet: $[M+6H]^{6+}$: 593.18; $[M+5H]^{5+}$: 711.62; $[M+4H]^{4+}$: 889.27; $[M+3H]^{3+}$: 1185.37).

6.9.5.4 Peptid 133a



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 330 nmol (11%).

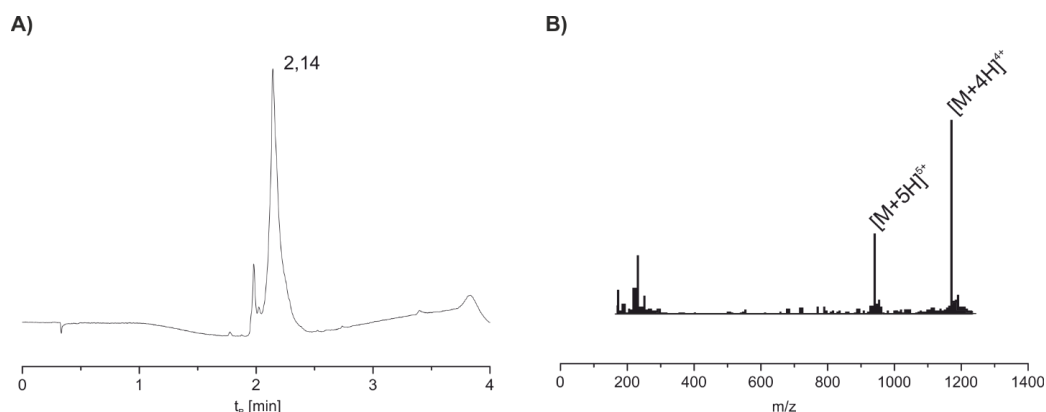


Abbildung 111: A) UPLC: $t_R = 2.14$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). B) ESI-MS: 4709.73 Da, m/z : $[M+5H]^{5+}$: 942.98; $[M+4H]^{4+}$: 1178.39 ($\text{C}_{213}\text{H}_{360}\text{N}_{50}\text{O}_{68}$, 4709.43 Da, berechnet: $[M+5H]^{5+}$: 942.33; $[M+4H]^{4+}$: 1177.66).

6.9.5.5 Peptid 133b



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 447 nmol (15%).

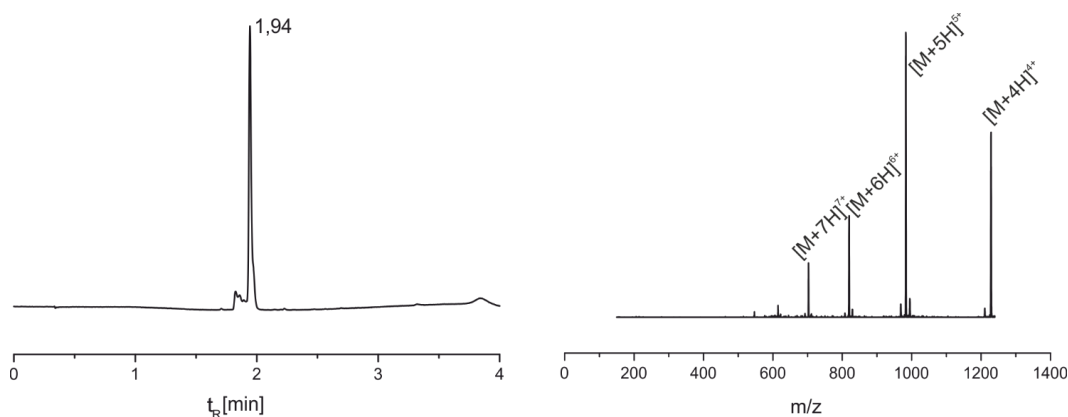


Abbildung 112: A) UPLC: $t_R = 1.94$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). B) ESI-MS: 4911.03 Da, m/z : $[M+7H]^{7+}$: 702.62; $[M+6H]^{6+}$: 819.36; $[M+5H]^{5+}$: 983.30; $[M+4H]^{4+}$: 1228.78 ($\text{C}_{211}\text{H}_{362}\text{N}_{52}\text{O}_{70}$, 4910.61 Da, berechnet: $[M+7H]^{7+}$: 702.10; $[M+6H]^{6+}$: 818.95; $[M+5H]^{5+}$: 982.54; $[M+4H]^{4+}$: 1227.93).

6.9.5.6 Peptid 133c



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 320 nmol (11%).

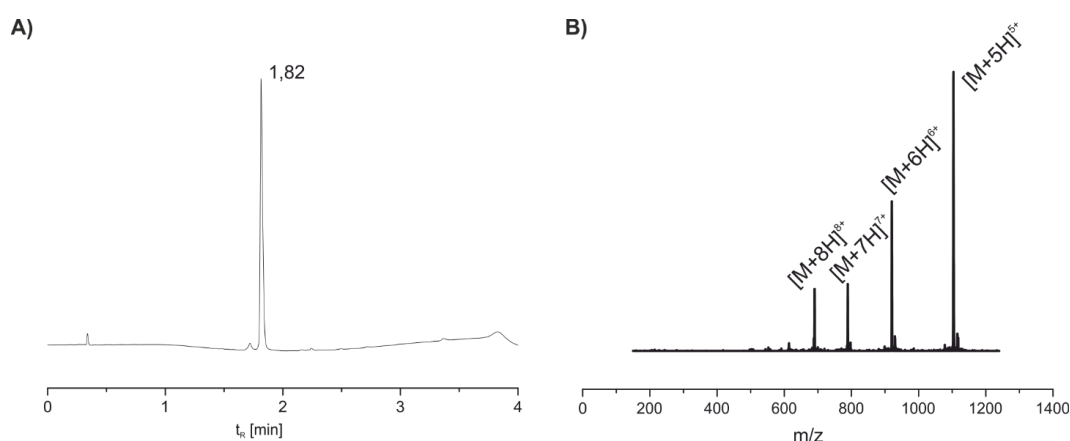


Abbildung 113: **A)** UPLC: $t_R = 1.82$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 5513.8 Da, m/z : $[M+8H]^{8+}$: 690.33; $[M+7H]^{7+}$: 788.98; $[M+6H]^{6+}$: 920.01; $[M+5H]^{5+}$: 1103.76 ($\text{C}_{241}\text{H}_{404}\text{N}_{62}\text{O}_{84}$, 5514.15 Da, calculated: $[M+8H]^{8+}$: 689.87; $[M+7H]^{7+}$: 788.28; $[M+6H]^{6+}$: 919.49; $[M+5H]^{5+}$: 1103.19).

6.9.5.7 Peptid 135a



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 1.49 μmol (50%).

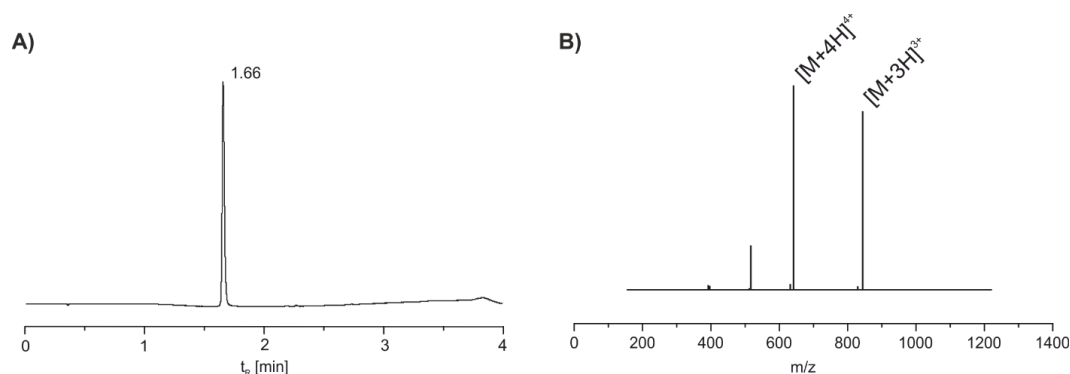


Abbildung 114: **A)** UPLC: $t_R = 1.66$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 2545.40 Da, m/z : $[M+4H]^{4+}$: 637.40; $[M+3H]^{3+}$: 849.39 ($\text{C}_{117}\text{H}_{206}\text{N}_{30}\text{O}_{30}\text{S}_1$, 2545.13 Da, calculated: $[M+4H]^{4+}$: 637.29; $[M+3H]^{3+}$: 849.39).

6.9.5.8 Peptid 135b



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 1.36 μmol (45%).

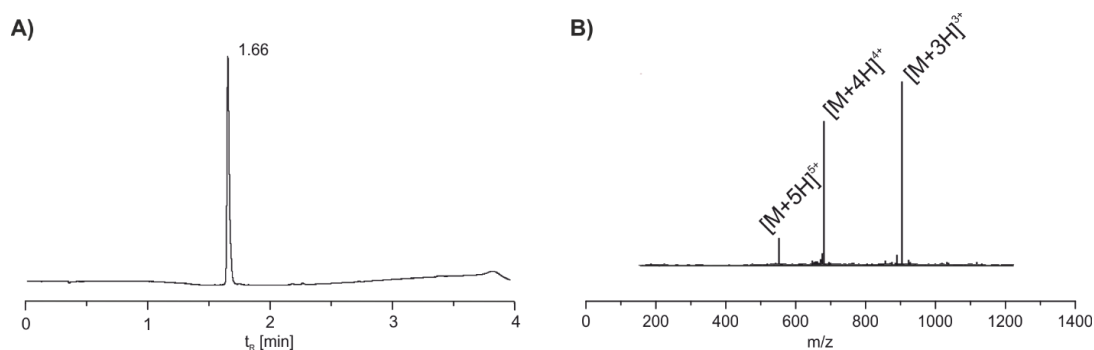


Abbildung 115: **A)** UPLC: $t_R = 1.66$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 2744.60 Da, m/z : $[M+3H]^{3+}$: 916.42; $[M+4H]^{4+}$: 687.53; $[M+5H]^{5+}$: 549.92 ($\text{C}_{124}\text{H}_{217}\text{N}_{33}\text{O}_{34}\text{S}_1$, 2744.59 Da, calculated: $[M+3H]^{3+}$: 915.87; $[M+4H]^{4+}$: 687.16; $[M+5H]^{5+}$: 549.92).

6.9.5.9 Peptid 135c



Die Synthese der Peptidsequenz wurde in einem 25 μmol Maßstab auf einem TentaGEL R RAM Harz (131.6 mg, 0.19 mmol/mg) mit Hilfe der automatisierten Festphasenpeptidsynthese nach Fmc-Protokoll durchgeführt. Aliquote von $\sim 3 \mu\text{M}$ wurden mit Hilfe der präparativen HPLC aufgereinigt. Ausbeute: 753 nmol (26%).

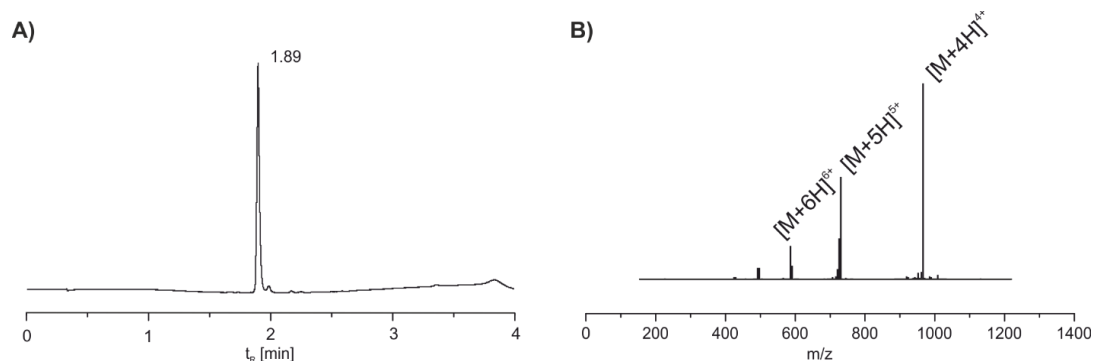


Abbildung 116: **A)** UPLC: $t_R = 1.89$ min (3% B \rightarrow 90% B in 4 min). **B)** ESI-MS: 2947.27 Da, m/z : $[M+3H]^{3+}$: 983.29; $[M+4H]^{4+}$: 737.90; $[M+5H]^{5+}$: 590.47 ($\text{C}_{131}\text{H}_{228}\text{N}_{36}\text{O}_{38}\text{S}_1$, 2947.49 Da, berechnet: $[M+3H]^{3+}$: 983.51; $[M+4H]^{4+}$: 737.88; $[M+5H]^{5+}$: 590.51).

7 SPEKTROSKOPISCHER ANHANG

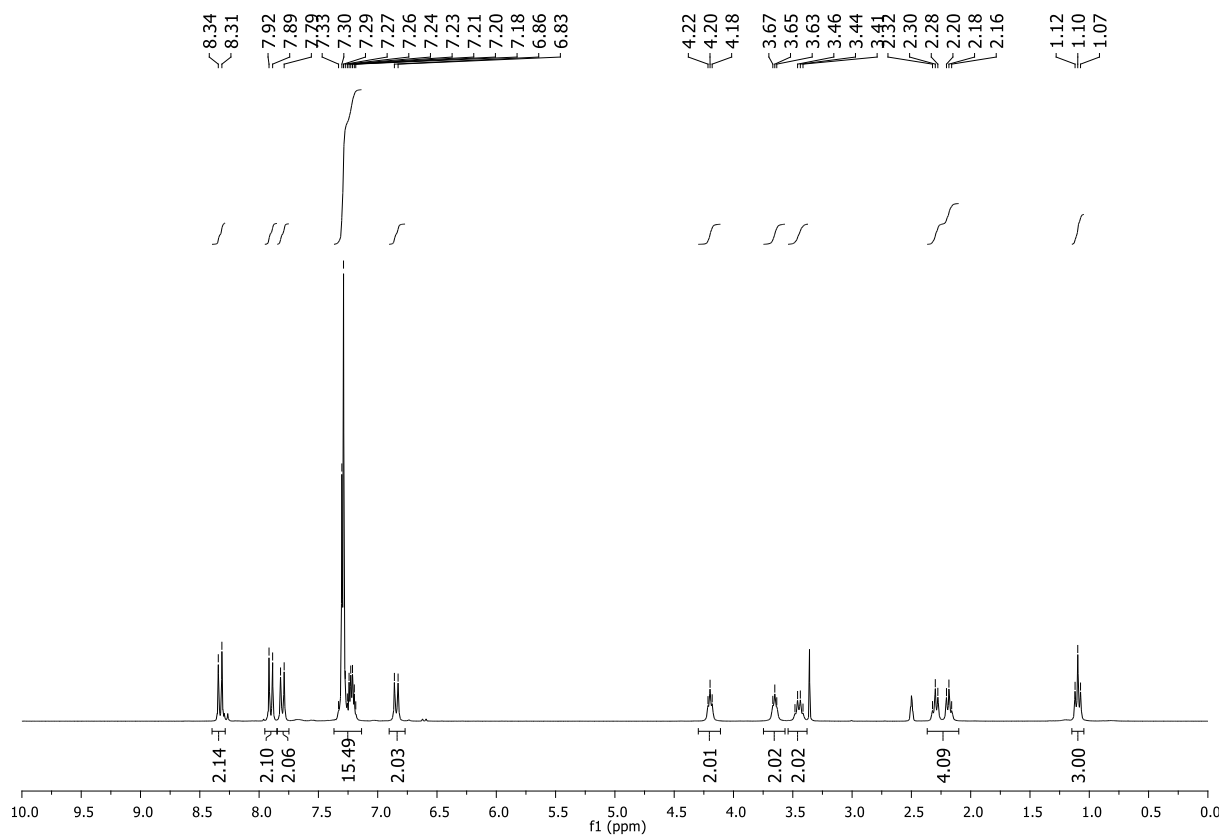


Abbildung 117: ¹H-NMR von 112.

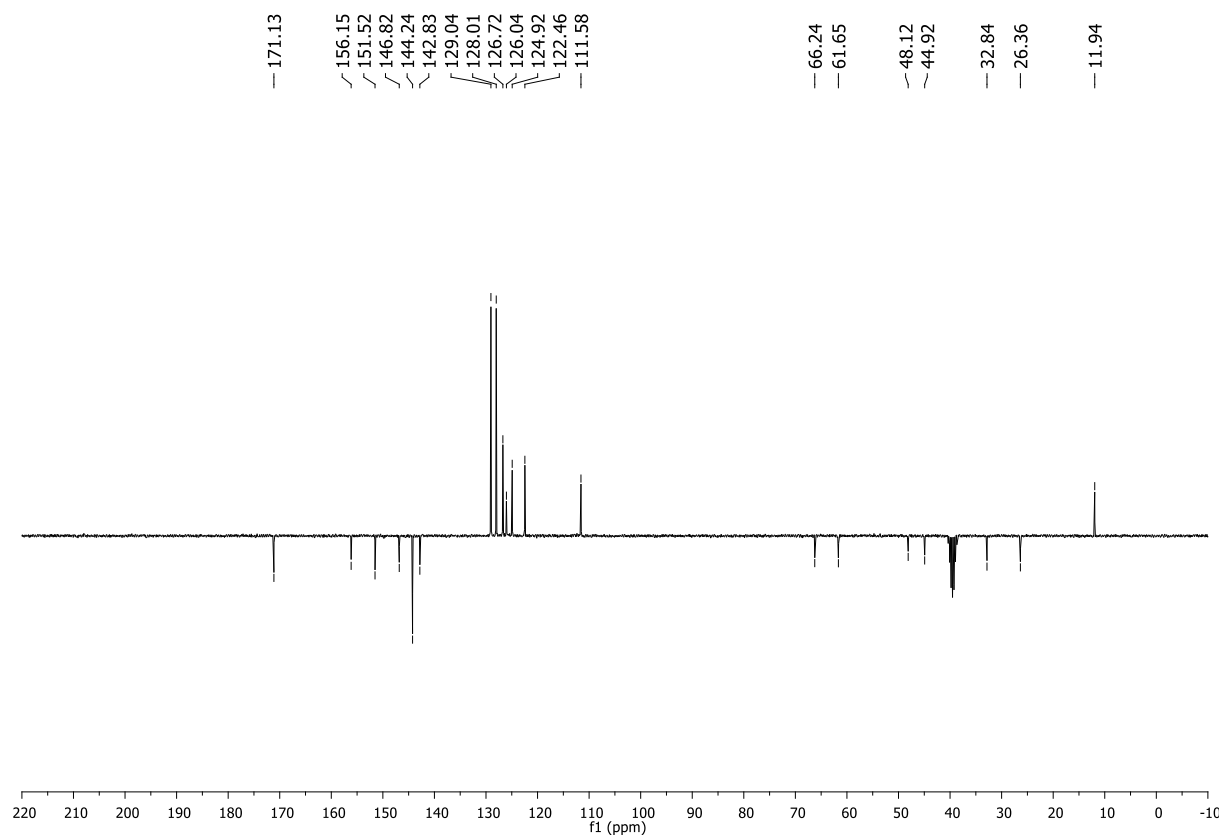


Abbildung 118: APT-NMR von 112.

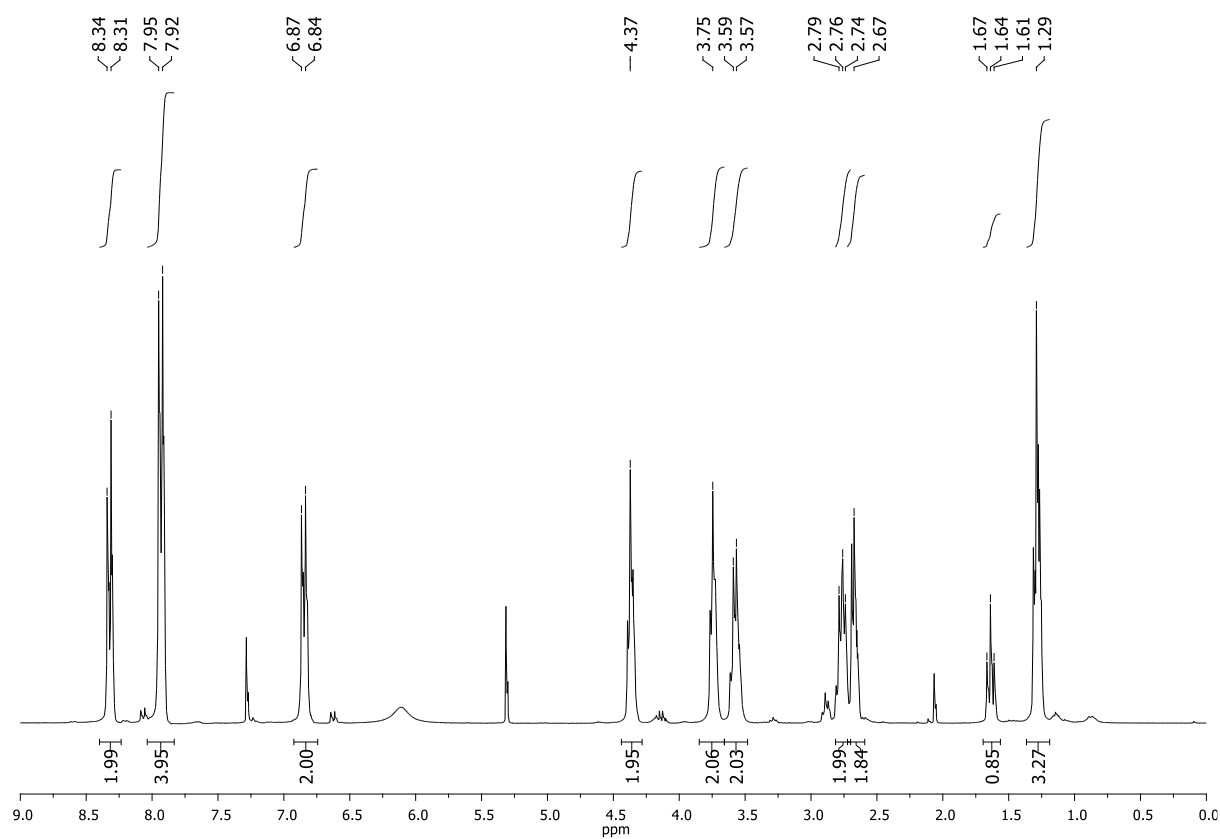


Abbildung 119: ^1H -NMR von HSQ.

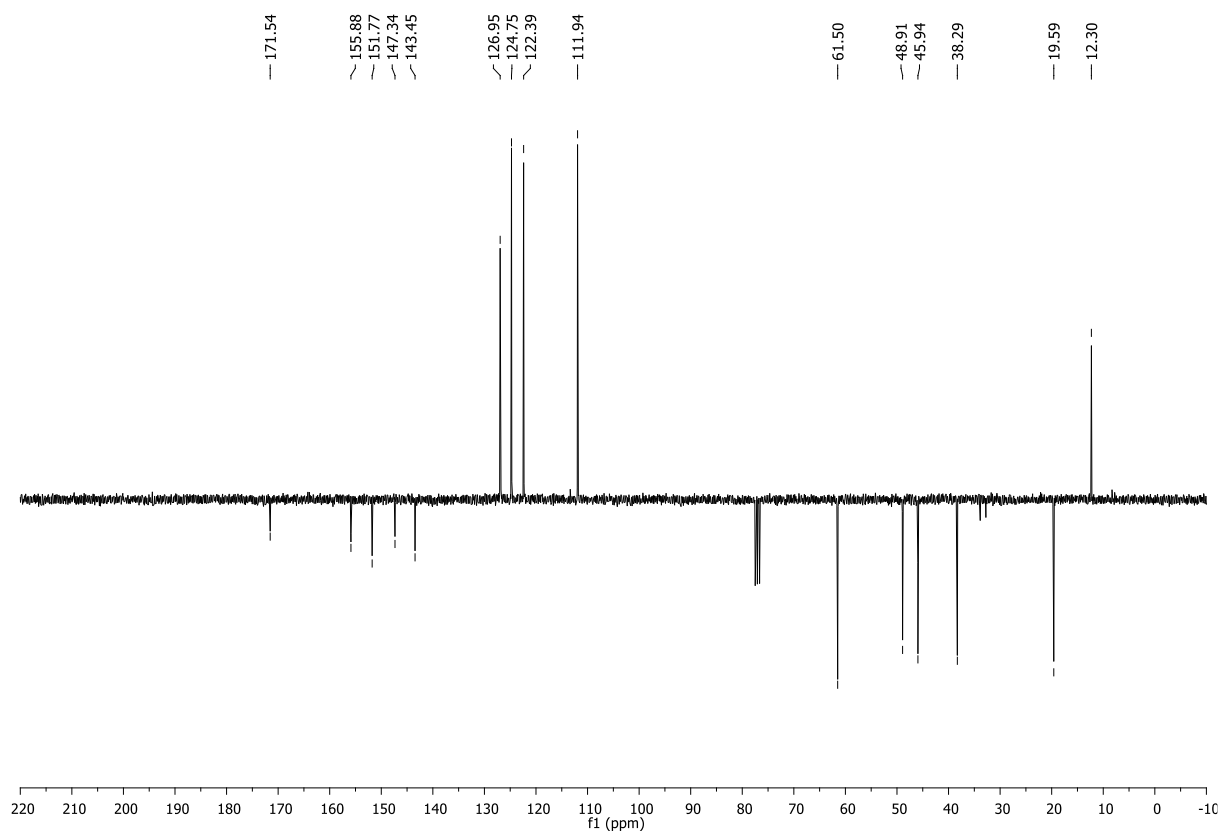


Abbildung 120: APT-NMR von HSQ.

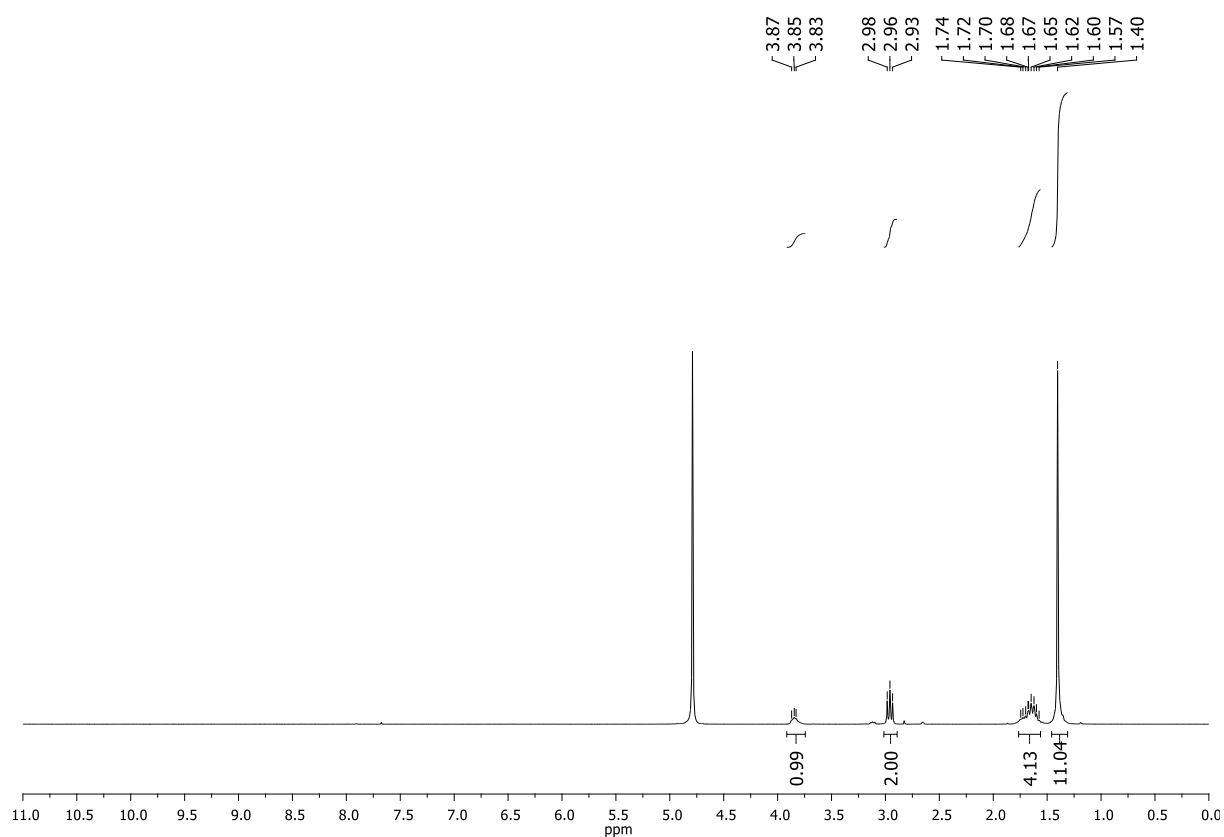


Abbildung 121: ^1H -NMR von N_α -(tert-Butoxycarbonyl)-L-Lysin.

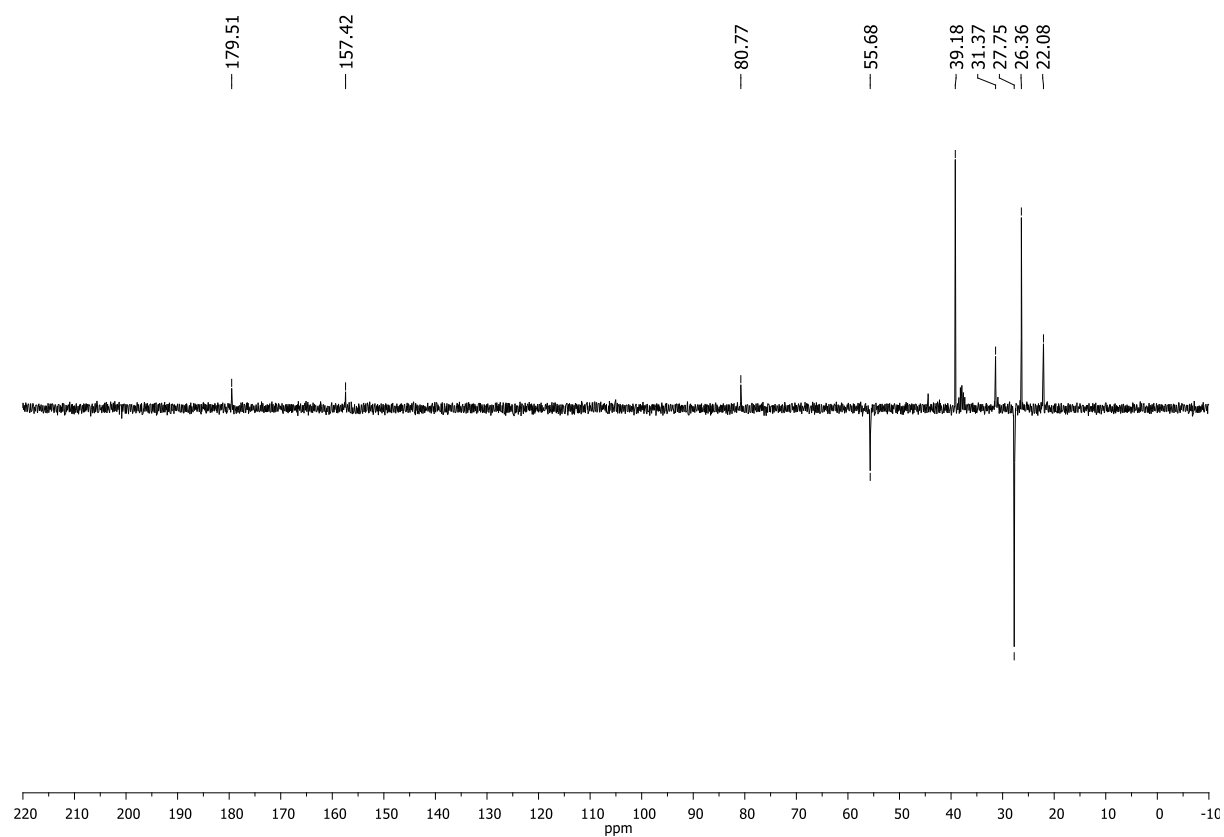


Abbildung 122: APT-NMR von N_α -(tert-Butoxycarbonyl)-L-Lysin.

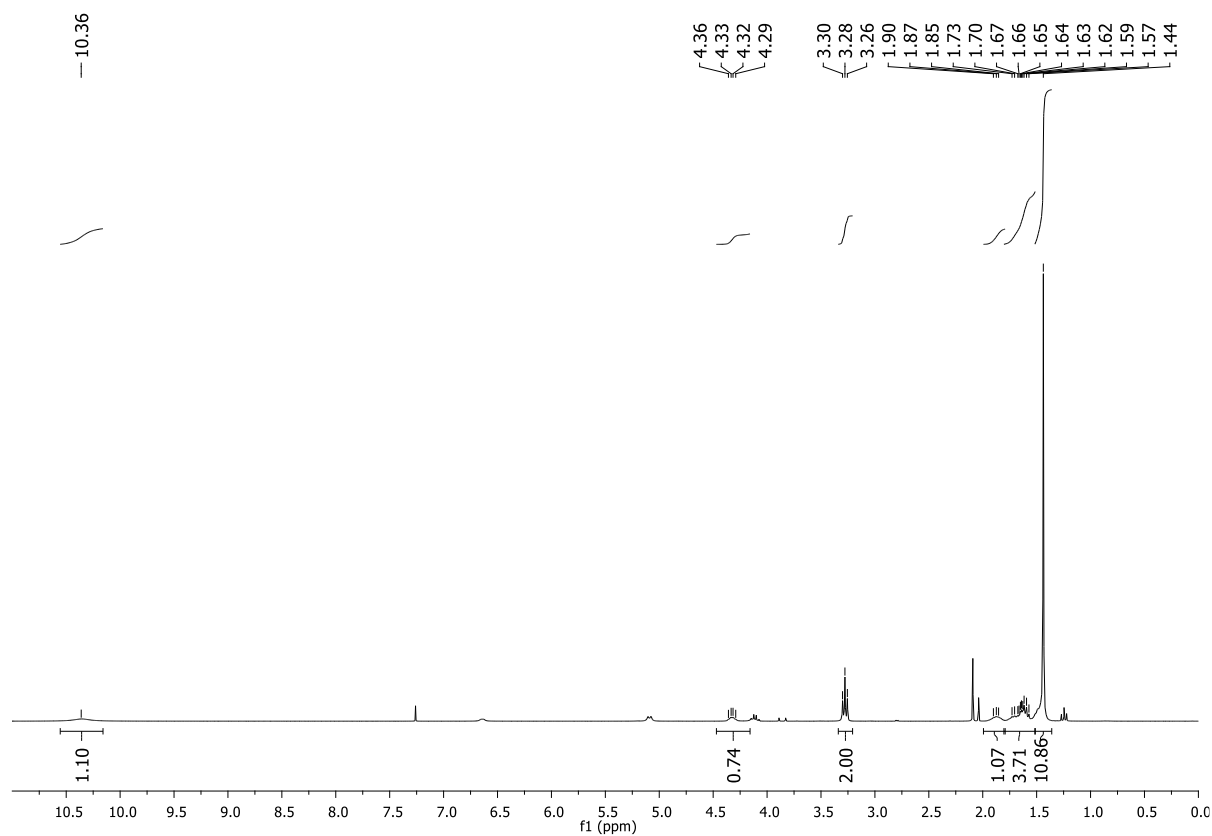


Abbildung 123: ^1H -NMR von **120**.

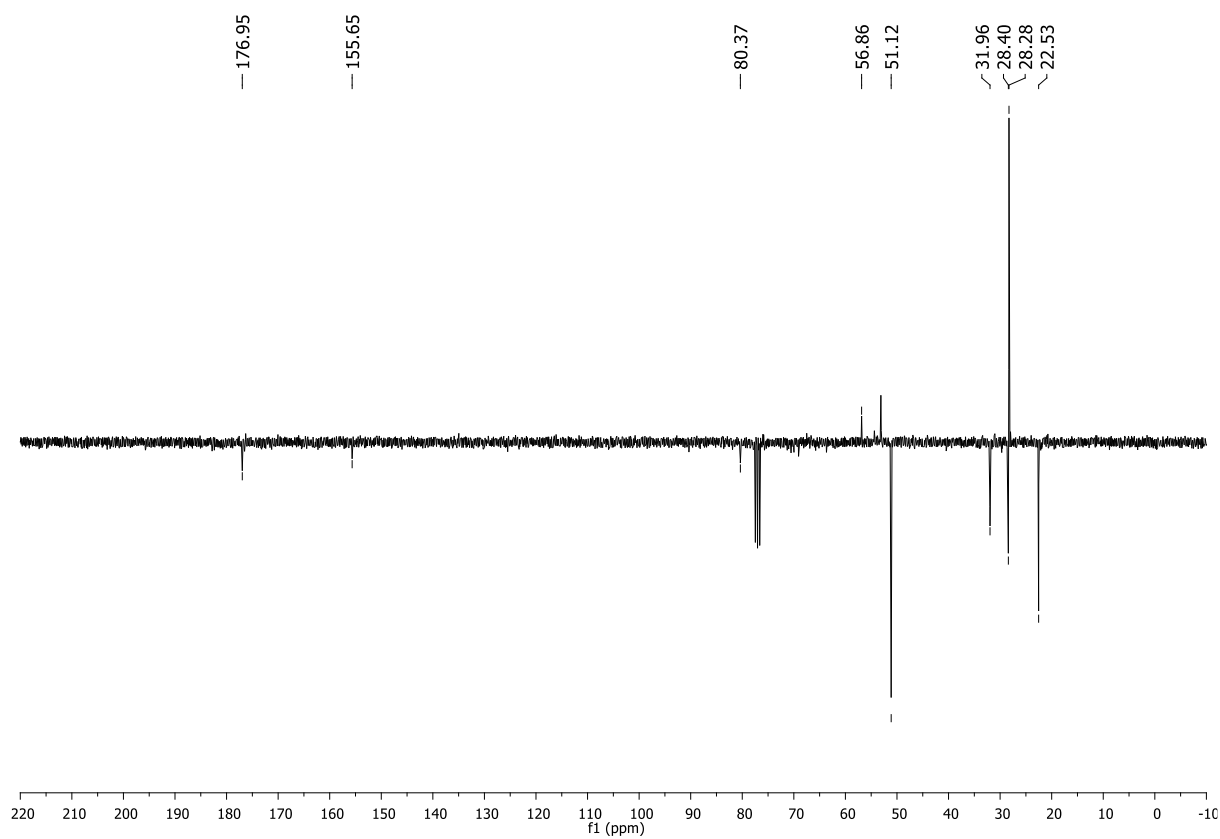


Abbildung 124: APT-NMR von **120**.

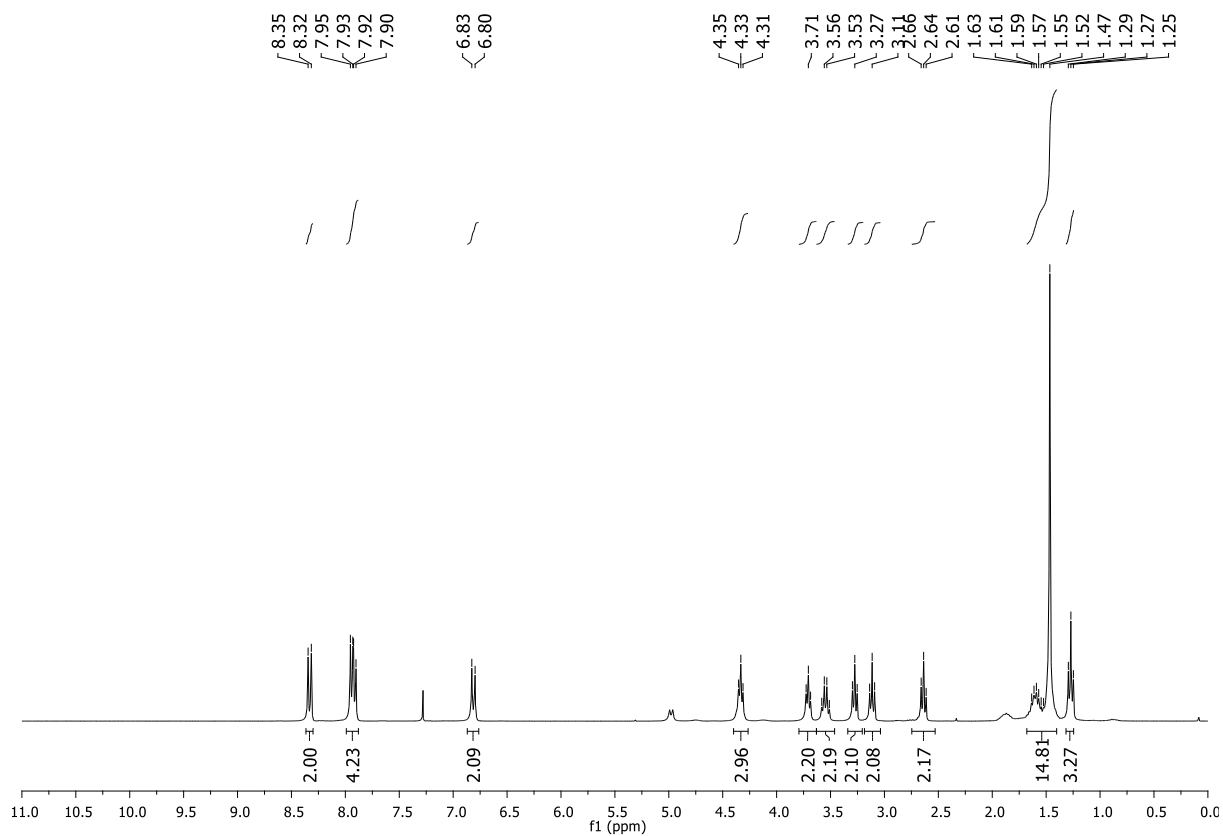


Abbildung 125: ¹H-NMR von 121.

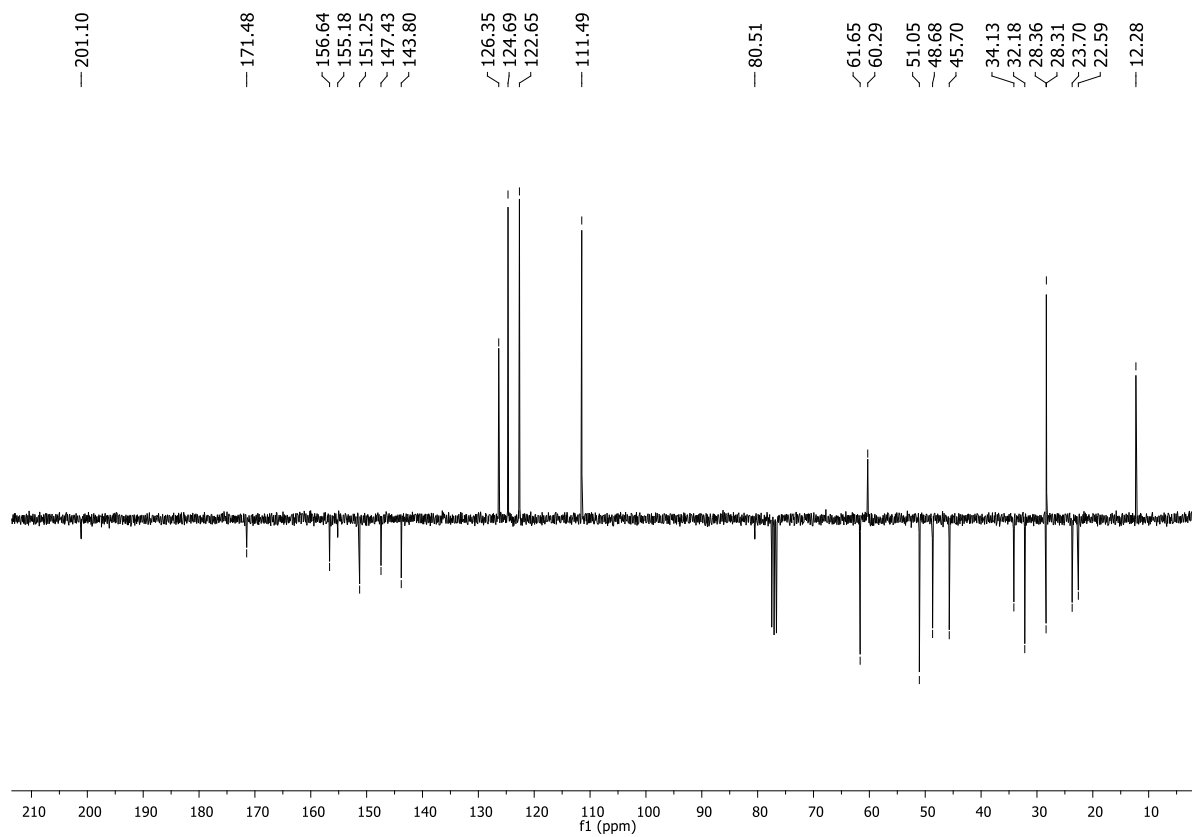


Abbildung 126: APT-NMR von 121.

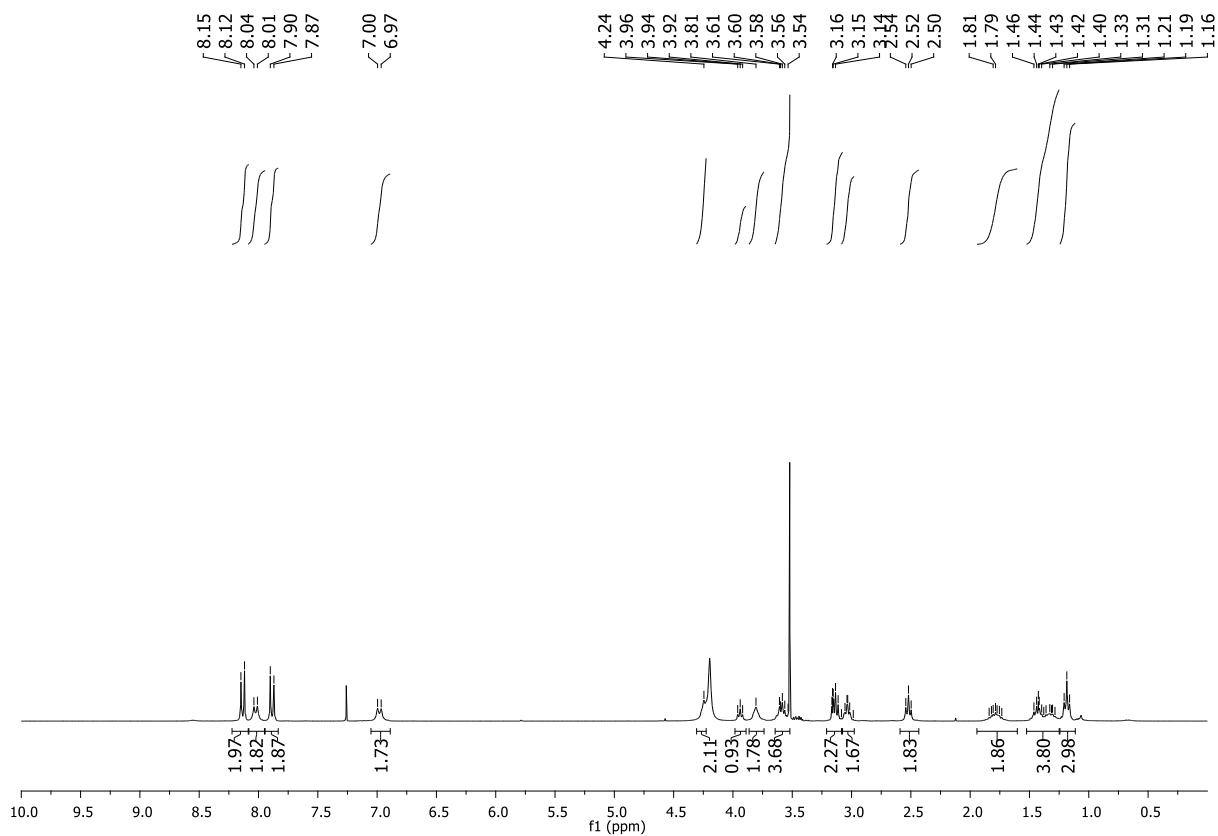


Abbildung 127: ^1H -NMR von **122**.

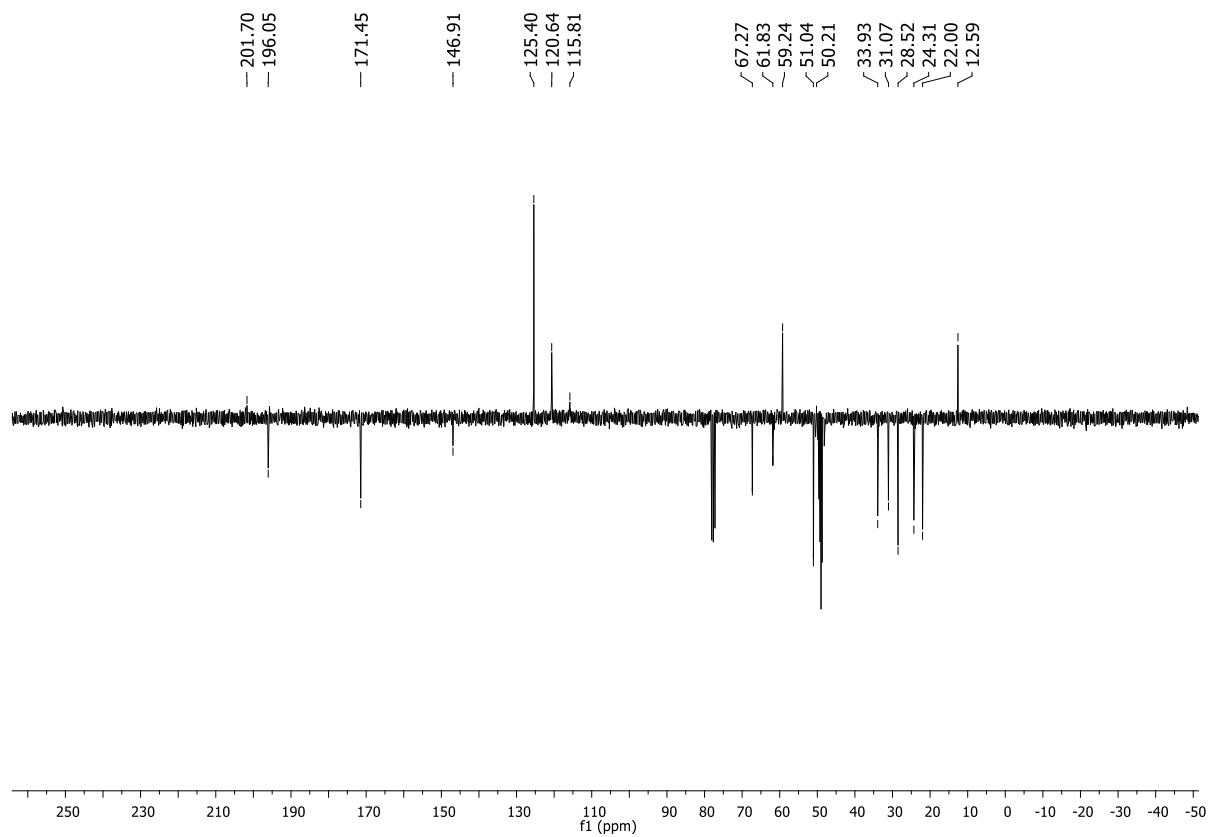


Abbildung 128: APT-NMR von **122**.

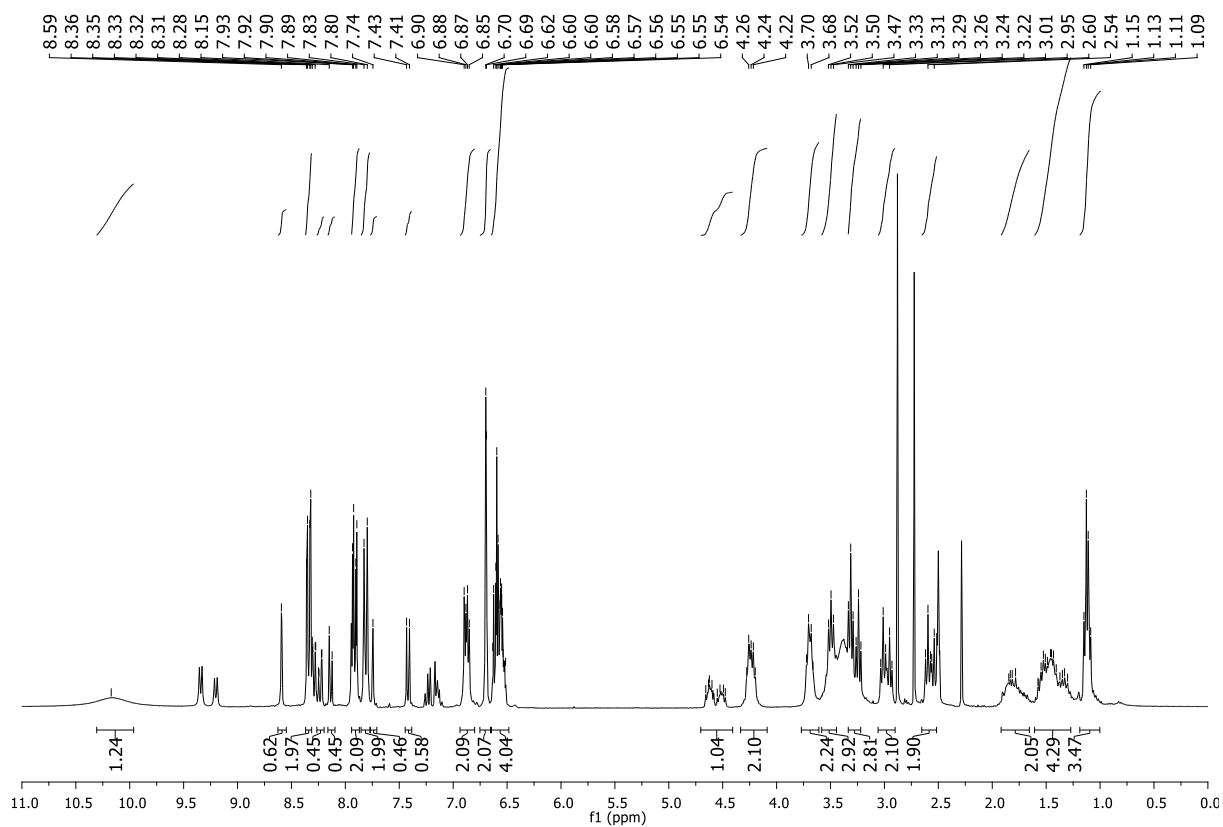


Abbildung 129: ^1H -NMR von 123.

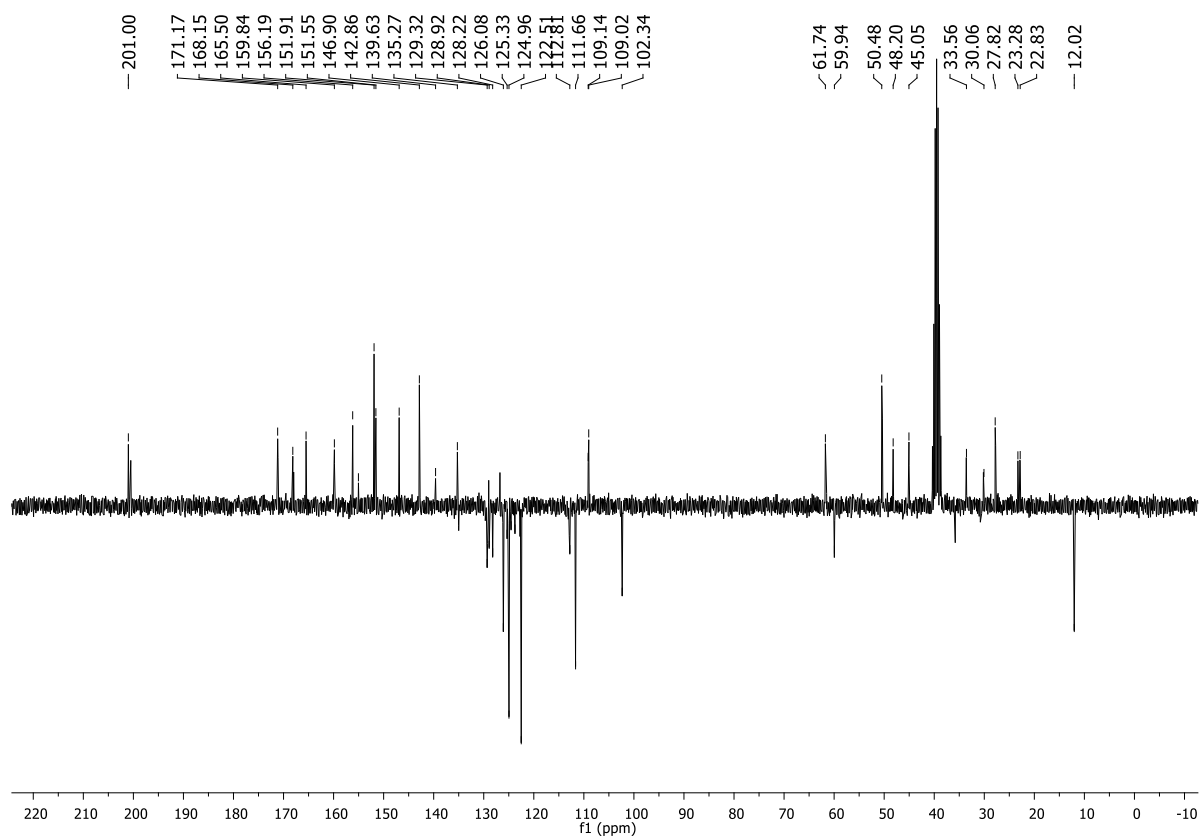


Abbildung 130: APT-NMR von 123.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Li, P. W.; Mural, R. J.; Sutton, G. G.; Smith, H. O.; Yandell, M.; Evans, C. A.; Holt, R. A.; Gocayne, J. D.; Amanatides, P.; Ballew, R. M.; Huson, D. H.; Wortman, J. R.; Zhang, Q.; Kodira, C. D.; Zheng, X. H.; Chen, L.; Skupski, M.; Subramanian, G.; Thomas, P. D.; Zhang, J.; Gabor Miklos, G. L.; Nelson, C.; Broder, S.; Clark, A. G.; Nadeau, J.; McKusick, V. A.; Zinder, N.; Levine, A. J.; Roberts, R. J.; Simon, M.; Slayman, C.; Hunkapiller, M.; Bolanos, R.; Delcher, A.; Dew, I.; Fasulo, D.; Flanigan, M.; Florea, L.; Halpern, A.; Hannenhalli, S.; Kravitz, S.; Levy, S.; Mobarry, C.; Reinert, K.; Remington, K.; Abu-Threideh, J.; Beasley, E.; Biddick, K.; Bonazzi, V.; Brandon, R.; Cargill, M.; Chandramouliswaran, I.; Charlab, R.; Chaturvedi, K.; Deng, Z.; Francesco, V. D.; Dunn, P.; Eilbeck, K.; Evangelista, C.; Gabrielian, A. E.; Gan, W.; Ge, W.; Gong, F.; Gu, Z.; Guan, P.; Heiman, T. J.; Higgins, M. E.; Ji, R.-R.; Ke, Z.; Ketchum, K. A.; Lai, Z.; Lei, Y.; Li, Z.; Li, J.; Liang, Y.; Lin, X.; Lu, F.; Merkulov, G. V.; Milshina, N.; Moore, H. M.; Naik, A. K.; Narayan, V. A.; Neelam, B.; Nusskern, D.; Rusch, D. B.; Salzberg, S.; Shao, W.; Shue, B.; Sun, J.; Wang, Z. Y.; Wang, A.; Wang, X.; Wang, J.; Wei, M.-H.; Wides, R.; Xiao, C.; Yan, C. *Science* **2001**, *291*, 1304.
- (2) International Human Genome Sequencing, C. *Nature* **2004**, *431*, 931.
- (3) Wilkins, M. R.; Pasquali, C.; Appel, R. D.; Ou, K.; Golaz, O.; Sanchez, J.-C.; Yan, J. X.; Gooley, A. A.; Hughes, G.; Humphery-Smith, I.; Williams, K. L.; Hochstrasser, D. F. *Bio/Technology* **1996**, *14*, 61.
- (4) Diller, L.; Kassel, J.; Nelson, C. E.; Gryka, M. A.; Litwak, G.; Gebhardt, M.; Bressac, B.; Ozturk, M.; Baker, S. J.; Vogelstein, B. *Molecular and Cellular Biology* **1990**, *10*, 5772.
- (5) Schafer, K. A. *Veterinary Pathology* **1998**, *35*, 461.
- (6) Matsuoka, S.; Huang, M.; Elledge, S. J. *Science* **1998**, *282*, 1893.
- (7) Mochly-Rosen, D. *Science* **1995**, *268*, 247.
- (8) Cohen, G. B.; Ren, R.; Baltimore, D. *Cell* **1995**, *80*, 237.
- (9) Ninfa, A. J.; Atkinson, M. R. *Trends in Microbiology* **2000**, *8*, 172.
- (10) Forterre, P. *Current Opinion in Microbiology* **2002**, *5*, 525.
- (11) Lehman, I. R.; Bessman, M. J.; Simms, E. S.; Kornberg, A. *Journal of Biological Chemistry* **1958**, *233*, 163.
- (12) Ten Dijke, P.; Goumans, M.-J.; Itoh, F.; Itoh, S. *Journal of Cellular Physiology* **2002**, *191*, 1.
- (13) Selinfreund, R. H.; Barger, S. W.; Pledger, W. J.; Van Eldik, L. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88*, 3554.
- (14) Rifai, N.; Gillette, M. A.; Carr, S. A. *Nat Biotech* **2006**, *24*, 971.
- (15) "Cancer control: Early detection WHO guide for effective programmes." from https://www.who.int/cancer/publications/cancer_control_detection/en/ [letzter Aufruf: 08.11.2020].
- (16) Zhang, D. Y.; Ye, F.; Gao, L.; Liu, X.; Zhao, X.; Che, Y.; Wang, H.; Wang, L.; Wu, J.; Song, D.; Liu, W.; Xu, H.; Jiang, B.; Zhang, W.; Wang, J.; Lee, P. *Cell Div* **2009**, *4*, 20.
- (17) Borrebaeck, C. A. K. *Nature Reviews Cancer* **2017**, *17*, 199.
- (18) Mattow, J.; Schmidt, F.; Höhenwarter, W.; Siejak, F.; Schaible, U. E.; Kaufmann, S. H. E. *PROTEOMICS* **2004**, *4*, 2927.
- (19) Rabilloud, T.; Chevallet, M.; Luche, S.; Lelong, C. *Journal of Proteomics* **2010**, *73*, 2064.

- (20) Rogowska-Wrzesinska, A.; Le Bihan, M.-C.; Thaysen-Andersen, M.; Roepstorff, P. *Journal of Proteomics* **2013**, 88, 4.
- (21) Timms, J. F.; Cramer, R. *PROTEOMICS* **2008**, 8, 4886.
- (22) Posadas, E. M.; Simpkins, F.; Liotta, L. A.; MacDonald, C.; Kohn, E. C. *Annals of Oncology* **2005**, 16, 16.
- (23) McCormack, A. L. *Methods* **2005**, 35, 209.
- (24) Stults, J. T.; Arnott, D. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: 2005; Vol. 402, p 245.
- (25) Gu, S.; Chen, X. *Analyst* **2005**, 130, 1225.
- (26) Kiyonami, R.; Schoen, A.; Prakash, A.; Peterman, S.; Zabrouskov, V.; Picotti, P.; Aebersold, R.; Huhmer, A.; Domon, B. *Molecular & Cellular Proteomics* **2011**, 10, M110.002931.
- (27) Tighe, P. J.; Ryder, R. R.; Todd, I.; Fairclough, L. C. *PROTEOMICS – Clinical Applications* **2015**, 9, 406.
- (28) Marik, J.; Lam, K. S. In *Chemical Genomics: Reviews and Protocols*; Zanders, E. D., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2005, p 217.
- (29) Haab, B. B. *Current Opinion in Biotechnology* **2006**, 17, 415.
- (30) Borrebaeck, C. A. K.; Wingren, C. *Journal of Proteomics* **2009**, 72, 928.
- (31) Bertone, P.; Snyder, M. *The FEBS Journal* **2005**, 272, 5400.
- (32) Resing, K. A.; Ahn, N. G. *FEBS Letters* **2005**, 579, 885.
- (33) Ellmark, P.; Ingvarsson, J.; Carlsson, A.; Lundin, B. S.; Wingren, C.; Borrebaeck, C. A. K. *Molecular & Cellular Proteomics* **2006**, 5, 1638.
- (34) Carlsson, A.; Wingren, C.; Ingvarsson, J.; Ellmark, P.; Baldertorp, B.; Fernö, M.; Olsson, H.; Borrebaeck, C. A. K. *European Journal of Cancer* **2008**, 44, 472.
- (35) Shao, C.; Chen, S.; Chen, L.; Cobos, E.; Wang, J.-S.; Haab, B. B.; Gao, W. *PROTEOMICS – Clinical Applications* **2009**, 3, 923.
- (36) Schmidt, A.; Forne, I.; Imhof, A. *BMC Syst Biol* **2014**, 8 Suppl 2, S3.
- (37) Jiménez-Munguía, I.; Pulzova, L.; Kanova, E.; Tomeckova, Z.; Majerova, P.; Bhide, K.; Comor, L.; Sirochmanova, I.; Kovac, A.; Bhide, M. *Scientific Reports* **2018**, 8, 5231.
- (38) Shruthi, B. S.; Vinodhkumar, P.; Selvamani *Advanced biomedical research* **2016**, 5, 67.
- (39) Tambor V, F. A., Lenco J, Kacerovský M, Reháček V, Stulík J, et al. *Physiol Res.* **2010**, 59, 471.
- (40) Feldmann, M.; Maini, R. N. *Annual Review of Immunology* **2001**, 19, 163.
- (41) Krueger, G. G.; Langley, R. G.; Leonardi, C.; Yeilding, N.; Guzzo, C.; Wang, Y.; Dooley, L. T.; Lebowitz, M. *New England Journal of Medicine* **2007**, 356, 580.
- (42) Voge, N. V.; Alvarez, E. *Biomedicines* **2019**, 7, 20.
- (43) Sliwowski, M. X.; Mellman, I. *Science* **2013**, 341, 1192.
- (44) *The Journal of Immunology* **1942**, 45, 159.
- (45) Haugland, R. P. In *Monoclonal Antibody Protocols*; Davis, W. C., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 1995, p 205.
- (46) Hermanson, G. T. In *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*; Hermanson, G. T., Ed.; Academic Press: Boston, 2013, p 1.
- (47) Schnaible, V.; Przybylski, M. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, 10, 861.
- (48) Vira, S.; Mekhedov, E.; Humphrey, G.; Blank, P. S. *Analytical Biochemistry* **2010**, 402, 146.

- (49) Peritz, T.; Zeng, F.; Kannanayakal, T. J.; Kilk, K.; Eiríksdóttir, E.; Langel, U.; Eberwine, J. *Nature Protocols* **2006**, *1*, 577.
- (50) Liu, X. S.; Brutlag, D. L.; Liu, J. S. *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 835.
- (51) Brown, J. P.; Wright, P. W.; Hart, C. E.; Woodbury, R. G.; Hellström, K. E.; Hellström, I. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, *255*, 4980.
- (52) Hughes, A. J.; Spelke, D. P.; Xu, Z.; Kang, C.-C.; Schaffer, D. V.; Herr, A. E. *Nature Methods* **2014**, *11*, 749.
- (53) Burnette, W. N. *Analytical Biochemistry* **1981**, *112*, 195.
- (54) Coons, A. H.; Creech, H. J.; Jones, R. N. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1941**, *47*, 200.
- (55) Xing, Y.; Chaudry, Q.; Shen, C.; Kong, K. Y.; Zhau, H. E.; Chung, L. W.; Petros, J. A.; O'Regan, R. M.; Yezhelyev, M. V.; Simons, J. W.; Wang, M. D.; Nie, S. *Nature Protocols* **2007**, *2*, 1152.
- (56) Van Eycke, Y.-R.; Allard, J.; Salmon, I.; Debeir, O.; Decaestecker, C. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 42964.
- (57) Engvall, E.; Perlmann, P. *Immunochemistry* **1971**, *8*, 871.
- (58) Van Weemen, B. K.; Schuurs, A. H. W. M. *FEBS Letters* **1971**, *15*, 232.
- (59) Engvall, E. *Clinical Chemistry* **2010**, *56*, 319.
- (60) Lindström, P.; Wager, O. *Scandinavian Journal of Immunology* **1978**, *7*, 419.
- (61) KATO, K.; HAMAGUCHI, Y.; OKAWA, S.; ISHIKAWA, E.; KOBAYASHI, K.; KATUNUMA, N. *The Journal of Biochemistry* **1977**, *82*, 261.
- (62) Yorde, D. E.; Sasse, E. A.; Wang, T. Y.; Hussa, R. O.; Garancis, J. C. *Clinical Chemistry* **1976**, *22*, 1372.
- (63) Chen, R.; Huang, X.; Xu, H.; Xiong, Y.; Li, Y. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7*, 28632.
- (64) Deng, H.; Liu, Q.; Wang, X.; Huang, R.; Liu, H.; Lin, Q.; Zhou, X.; Xing, D. *Biosens Bioelectron* **2017**, *87*, 931.
- (65) Lequin, R. M. *Clinical Chemistry* **2005**, *51*, 2415.
- (66) Marcobal, A.; Polo, M. C.; Martín-Álvarez, P. J.; Moreno-Arribas, M. V. *Food Research International* **2005**, *38*, 387.
- (67) de la Rica, R.; Stevens, M. M. *Nature Nanotechnology* **2012**, *7*, 821.
- (68) Koppelman, S. J.; Lakemond, C. M. M.; Vlooswijk, R.; Hefle, S. L. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **2019**, *87*, 1398.
- (69) Wulfkühle, J. D.; Liotta, L. A.; Petricoin, E. F. *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3*, 267.
- (70) Xia, N.; Wang, X.; Zhou, B.; Wu, Y.; Mao, W.; Liu, L. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8*, 19303.
- (71) Zheng, T.; Pierre-Pierre, N.; Yan, X.; Huo, Q.; Almodovar, A. J. O.; Valerio, F.; Rivera-Ramirez, I.; Griffith, E.; Decker, D. D.; Chen, S.; Zhu, N. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7*, 6819.
- (72) Morley, S. J.; Jones, D. G. *Journal of Applied Bacteriology* **1980**, *49*, 103.
- (73) Wu, Y.; Guo, W.; Peng, W.; Zhao, Q.; Piao, J.; Zhang, B.; Wu, X.; Wang, H.; Gong, X.; Chang, J. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9*, 9369.
- (74) Sun, J.; Hu, T.; Xu, X.; Wang, L.; Yang, X. *Nanoscale* **2016**, *8*, 16846.
- (75) Szarka, A.; Rigó, J.; Lázár, L.; Bekő, G.; Molvarec, A. *BMC Immunology* **2010**, *11*, 59.
- (76) Tsien, R. Y. *Annual Review of Biochemistry* **1998**, *67*, 509.
- (77) Shaner, N. C.; Campbell, R. E.; Steinbach, P. A.; Giepmans, B. N. G.; Palmer, A. E.; Tsien, R. Y. *Nature Biotechnology* **2004**, *22*, 1567.

- (78) Thorn, K. *Molecular Biology of the Cell* **2017**, 28, 848.
- (79) Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O. W.; Olenych, S.; Bonifacino, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F. *Science* **2006**, 313, 1642.
- (80) Rodriguez, E. A.; Campbell, R. E.; Lin, J. Y.; Lin, M. Z.; Miyawaki, A.; Palmer, A. E.; Shu, X.; Zhang, J.; Tsien, R. Y. *Trends in Biochemical Sciences* **2017**, 42, 111.
- (81) Remington, S. J. *Current Opinion in Structural Biology* **2006**, 16, 714.
- (82) Jaumouillé, V.; Francetic, O.; Sansonetti, P. J.; Tran Van Nhieu, G. *EMBO J* **2008**, 27, 447.
- (83) Feilmeier, B. J.; Iseminger, G.; Schroeder, D.; Webber, H.; Phillips, G. J. *Journal of Bacteriology* **2000**, 182, 4068.
- (84) Veal, E. A.; Day, A. M.; Morgan, B. A. *Molecular Cell* **2007**, 26, 1.
- (85) Hussain, S. P.; Hofseth, L. J.; Harris, C. C. *Nature Reviews Cancer* **2003**, 3, 276.
- (86) Weitzman, S.; Gordon, L. *Blood* **1990**, 76, 655.
- (87) Uttara, B.; Singh, A. V.; Zamboni, P.; Mahajan, R. T. *Curr Neuropharmacol* **2009**, 7, 65.
- (88) Jullien, L.; Gautier, A. *Methods and Applications in Fluorescence* **2015**, 3, 042007.
- (89) Li, C.; Tebo, A. G.; Gautier, A. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, 18, 1473.
- (90) Buckley, A. M.; Petersen, J.; Roe, A. J.; Douce, G. R.; Christie, J. M. *Current Opinion in Chemical Biology* **2015**, 27, 39.
- (91) Drepper, T.; Gensch, T.; Pohl, M. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2013**, 12, 1125.
- (92) Kumagai, A.; Ando, R.; Miyatake, H.; Greimel, P.; Kobayashi, T.; Hirabayashi, Y.; Shimogori, T.; Miyawaki, A. *Cell* **2013**, 153, 1602.
- (93) Shu, X.; Royant, A.; Lin, M. Z.; Aguilera, T. A.; Lev-Ram, V.; Steinbach, P. A.; Tsien, R. Y. *Science* **2009**, 324, 804.
- (94) Guo, Z.; Nam, S.; Park, S.; Yoon, J. *Chemical Science* **2012**, 3, 2760.
- (95) Leem, J. W.; Allcca, A. E. L.; Chen, J.; Kim, S.-W.; Kim, K.-Y.; Choi, K.-H.; Chen, Y. P.; Kim, S.-R.; Kim, Y. L. *Opt. Express* **2018**, 26, 31817.
- (96) Yu, D.; Baird, M. A.; Allen, J. R.; Howe, E. S.; Klassen, M. P.; Reade, A.; Makhijani, K.; Song, Y.; Liu, S.; Murthy, Z.; Zhang, S.-Q.; Weiner, O. D.; Kornberg, T. B.; Jan, Y.-N.; Davidson, M. W.; Shu, X. *Nature Methods* **2015**, 12, 763.
- (97) Shcherbakova, D. M.; Verkhusha, V. V. *Nature Methods* **2013**, 10, 751.
- (98) Shcherbakova, D. M.; Balaban, M.; Emelyanov, A. V.; Brenowitz, M.; Guo, P.; Verkhusha, V. V. *Nature Communications* **2016**, 7, 12405.
- (99) Rodriguez, E. A.; Tran, G. N.; Gross, L. A.; Crisp, J. L.; Shu, X.; Lin, J. Y.; Tsien, R. Y. *Nature Methods* **2016**, 13, 763.
- (100) Keppler, A.; Gendreizig, S.; Gronemeyer, T.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K. *Nature Biotechnology* **2003**, 21, 86.
- (101) Keppler, A.; Pick, H.; Arrivoli, C.; Vogel, H.; Johnsson, K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, 9955.
- (102) Gautier, A.; Juillerat, A.; Heinis, C.; Corrêa, I. R.; Kindermann, M.; Beaufls, F.; Johnsson, K. *Chemistry & Biology* **2008**, 15, 128.
- (103) Los, G. V.; Encell, L. P.; McDougall, M. G.; Hartzell, D. D.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Wood, M. G.; Learish, R.; Ohana, R. F.; Urh, M.; Simpson, D.; Mendez, J.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Vidugiris, G.; Zhu, J.; Darzins, A.; Klaubert, D. H.; Bulleit, R. F.; Wood, K. V. *ACS Chemical Biology* **2008**, 3, 373.

- (104) Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y. *Science* **1998**, *281*, 269.
- (105) Adams, S. R.; Campbell, R. E.; Gross, L. A.; Martin, B. R.; Walkup, G. K.; Yao, Y.; Llopis, J.; Tsien, R. Y. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 6063.
- (106) Halo, T. L.; Appelbaum, J.; Hobert, E. M.; Balkin, D. M.; Schepartz, A. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 438.
- (107) Cao, H.; Xiong, Y.; Wang, T.; Chen, B.; Squier, T. C.; Mayer, M. U. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 8672.
- (108) Cao, H.; Chen, B.; Squier, T. C.; Mayer, M. U. *Chemical Communications* **2006**, 2601.
- (109) Mantovani, G.; Lecolley, F.; Tao, L.; Haddleton, D. M.; Clerx, J.; Cornelissen, J. J. L. M.; Velonia, K. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 2966.
- (110) Kalia, D.; Malekar, P. V.; Parthasarathy, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 1432.
- (111) Kalia, D.; Pawar, S. P.; Thopate, J. S. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 1885.
- (112) Bernardim, B.; Cal, P. M. S. D.; Matos, M. J.; Oliveira, B. L.; Martínez-Sáez, N.; Albuquerque, I. S.; Perkins, E.; Corzana, F.; Burtoloso, A. C. B.; Jiménez-Osés, G.; Bernardes, G. J. L. *Nature Communications* **2016**, *7*, 13128.
- (113) Matos, M. J.; Navo, C. D.; Hakala, T.; Ferhati, X.; Guerreiro, A.; Hartmann, D.; Bernardim, B.; Saar, K. L.; Compañón, I.; Corzana, F.; Knowles, T. P. J.; Jiménez-Osés, G.; Bernardes, G. J. L. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58*, 6640.
- (114) Shindo, N.; Fuchida, H.; Sato, M.; Watari, K.; Shibata, T.; Kuwata, K.; Miura, C.; Okamoto, K.; Hatsuyama, Y.; Tokunaga, K.; Sakamoto, S.; Morimoto, S.; Abe, Y.; Shiroishi, M.; Caaveiro, J. M. M.; Ueda, T.; Tamura, T.; Matsunaga, N.; Nakao, T.; Koyanagi, S.; Ohdo, S.; Yamaguchi, Y.; Hamachi, I.; Ono, M.; Ojida, A. *Nature Chemical Biology* **2019**, *15*, 250.
- (115) Weerapana, E.; Wang, C.; Simon, G. M.; Richter, F.; Khare, S.; Dillon, M. B. D.; Bachovchin, D. A.; Mowen, K.; Baker, D.; Cravatt, B. F. *Nature* **2010**, *468*, 790.
- (116) Antos, J. M.; McFarland, J. M.; Iavarone, A. T.; Francis, M. B. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 6301.
- (117) Hansen, M. B.; Hubálek, F.; Skrydstrup, T.; Hoeg-Jensen, T. *Chemistry – A European Journal* **2016**, *22*, 1572.
- (118) Seki, Y.; Ishiyama, T.; Sasaki, D.; Abe, J.; Sohma, Y.; Oisaki, K.; Kanai, M. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 10798.
- (119) Imiolek, M.; Karunanithy, G.; Ng, W.-L.; Baldwin, A. J.; Gouverneur, V.; Davis, B. G. *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 1568.
- (120) Joshi, N. S.; Whitaker, L. R.; Francis, M. B. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15942.
- (121) Tilley, S. D.; Francis, M. B. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 1080.
- (122) Ohata, J.; Miller, M. K.; Mountain, C. M.; Vohidov, F.; Ball, Z. T. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 2827.
- (123) Lin, S.; Yang, X.; Jia, S.; Weeks, A. M.; Hornsby, M.; Lee, P. S.; Nichiporuk, R. V.; Iavarone, A. T.; Wells, J. A.; Toste, F. D.; Chang, C. J. *Science* **2017**, *355*, 597.
- (124) Taylor, M. T.; Nelson, J. E.; Suero, M. G.; Gaunt, M. J. *Nature* **2018**, *562*, 563.

- (125) Jia, S.; He, D.; Chang, C. J. *Journal of the American Chemical Society* **2019**, *141*, 7294.
- (126) Takahashi, K. *The Journal of Biochemistry* **1976**, *80*, 1267.
- (127) Uchida, K.; Stadtman, E. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*, 4544.
- (128) Ohata, J.; Minus, M. B.; Abernathy, M. E.; Ball, Z. T. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 7472.
- (129) Mangubat-Medina, A. E.; Martin, S. C.; Hanaya, K.; Ball, Z. T. *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 8401.
- (130) McGrath, N. A.; Andersen, K. A.; Davis, A. K. F.; Lomax, J. E.; Raines, R. T. *Chemical Science* **2015**, *6*, 752.
- (131) Totaro, K. A.; Liao, X.; Bhattacharya, K.; Finneman, J. I.; Sperry, J. B.; Massa, M. A.; Thorn, J.; Ho, S. V.; Pentelute, B. L. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27*, 994.
- (132) Bloom, S.; Liu, C.; Kölmel, D. K.; Qiao, J. X.; Zhang, Y.; Poss, M. A.; Ewing, W. R.; MacMillan, D. W. C. *Nature Chemistry* **2018**, *10*, 205.
- (133) Purushottam, L.; Adusumalli, S. R.; Chilamari, M.; Rai, V. *Chemical Communications* **2017**, *53*, 959.
- (134) Matos, M. J.; Oliveira, B. L.; Martínez-Sáez, N.; Guerreiro, A.; Cal, P. M. S. D.; Bertoldo, J.; Maneiro, M.; Perkins, E.; Howard, J.; Deery, M. J.; Chalker, J. M.; Corzana, F.; Jiménez-Osés, G.; Bernardes, G. J. L. *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 4004.
- (135) Rosen, C. B.; Francis, M. B. *Nature Chemical Biology* **2017**, *13*, 697.
- (136) Chan, A. O.-Y.; Ho, C.-M.; Chong, H.-C.; Leung, Y.-C.; Huang, J.-S.; Wong, M.-K.; Che, C.-M. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 2589.
- (137) Raj, M.; Wu, H.; Blosser, S. L.; Vittoria, M. A.; Arora, P. S. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 6932.
- (138) Gilmore, J. M.; Scheck, R. A.; Esser-Kahn, A. P.; Joshi, N. S.; Francis, M. B. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 5307.
- (139) MacDonald, J. I.; Munch, H. K.; Moore, T.; Francis, M. B. *Nature Chemical Biology* **2015**, *11*, 326.
- (140) Tsukiji, S.; Miyagawa, M.; Takaoka, Y.; Tamura, T.; Hamachi, I. *Nature Chemical Biology* **2009**, *5*, 341.
- (141) Tsukiji, S.; Wang, H.; Miyagawa, M.; Tamura, T.; Takaoka, Y.; Hamachi, I. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 9046.
- (142) Fujishima, S.-h.; Yasui, R.; Miki, T.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 3961.
- (143) Tamura, T.; Hamachi, I. *Journal of the American Chemical Society* **2019**, *141*, 2782.
- (144) Naylor, R.; Gilham, P. T. *Biochemistry* **1966**, *5*, 2722.
- (145) von Kiedrowski, G. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1986**, *25*, 932.
- (146) Wu, T.; Orgel, L. E. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 7963.
- (147) Orgel, L. E. *Accounts of Chemical Research* **1995**, *28*, 109.
- (148) Wu, T.; Orgel, L. E. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 5496.
- (149) Xu, Y.; Kool, E. T. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 9040.
- (150) Herrlein, M. K.; Nelson, J. S.; Letsinger, R. L. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 10151.

- (151) Sando, S.; Kool, E. T. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 2096.
- (152) Kleiner, R. E.; Dumelin, C. E.; Liu, D. R. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*, 5707.
- (153) Fosgerau, K.; Hoffmann, T. *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 122.
- (154) Gorska, K.; Winssinger, N. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 6820.
- (155) Gartner, Z. J.; Tse, B. N.; Grubina, R.; Doyon, J. B.; Snyder, T. M.; Liu, D. R. *Science* **2004**, *305*, 1601.
- (156) Kleiner, R. E.; Dumelin, C. E.; Tiu, G. C.; Sakurai, K.; Liu, D. R. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 11779.
- (157) Tse, B. N.; Snyder, T. M.; Shen, Y.; Liu, D. R. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 15611.
- (158) Georgiou, G.; Kleiner, R. E.; Pulkoski-Gross, M.; Liu, D. R.; Seeliger, M. A. *Nature Chemical Biology* **2012**, *8*, 366.
- (159) Cai, J.; Li, X.; Yue, X.; Taylor, J. S. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 16324.
- (160) Grossmann, T. N.; Seitz, O. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 15596.
- (161) Shibata, A.; Uzawa, T.; Nakashima, Y.; Ito, M.; Nakano, Y.; Shuto, S.; Ito, Y.; Abe, H. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 14172.
- (162) Wu, H.; Cisneros, B. T.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 17942.
- (163) Gartner, Z. J.; Liu, D. R. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 6961.
- (164) Gartner, Z. J.; Kanan, M. W.; Liu, D. R. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1796.
- (165) Gartner, Z. J.; Grubina, R.; Calderone, C. T.; Liu, D. R. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 1370.
- (166) Golub, T. R.; Slonim, D. K.; Tamayo, P.; Huard, C.; Gaasenbeek, M.; Mesirov, J. P.; Coller, H.; Loh, M. L.; Downing, J. R.; Caligiuri, M. A.; Bloomfield, C. D.; Lander, E. S. *Science* **1999**, *286*, 531.
- (167) Gerhold, D.; Rushmore, T.; Caskey, C. T. *Trends in Biochemical Sciences* **1999**, *24*, 168.
- (168) Ma, Z.; Taylor, J.-S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 11159.
- (169) Ma, Z.; Taylor, J.-S. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14*, 679.
- (170) Jacobsen, M. F.; Cló, E.; Mokhir, A.; Gothelf, K. V. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 793.
- (171) Lapenta, F.; Aupič, J.; Strmšek, Ž.; Jerala, R. *Chemical Society Reviews* **2018**, *47*, 3530.
- (172) Ljubetič, A.; Lapenta, F.; Gradišar, H.; Drobnak, I.; Aupič, J.; Strmšek, Ž.; Lainšček, D.; Hafner-Bratkovič, I.; Majerle, A.; Krivec, N.; Benčina, M.; Pisanski, T.; Veličković, T. Č.; Round, A.; Carazo, J. M.; Melero, R.; Jerala, R. *Nature Biotechnology* **2017**, *35*, 1094.
- (173) Gradišar, H.; Božič, S.; Doles, T.; Vengust, D.; Hafner-Bratkovič, I.; Mertelj, A.; Webb, B.; Šali, A.; Klavžar, S.; Jerala, R. *Nature Chemical Biology* **2013**, *9*, 362.
- (174) Lupas, A. *Trends in Biochemical Sciences* **1996**, *21*, 375.
- (175) Crick, F. *Acta Crystallographica* **1953**, *6*, 689.

- (176) Lupas, A. N.; Gruber, M. In *Advances in Protein Chemistry*; Academic Press: 2005; Vol. 70, p 37.
- (177) Walshaw, J.; Woolfson, D. N. *Journal of Structural Biology* **2003**, *144*, 349.
- (178) Litowski, J. R.; Hodges, R. S. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 37272.
- (179) Rothmund, P. W. K. *Nature* **2006**, *440*, 297.
- (180) Goodman, R. P.; Schaap, I. A. T.; Tardin, C. F.; Erben, C. M.; Berry, R. M.; Schmidt, C. F.; Turberfield, A. J. *Science* **2005**, *310*, 1661.
- (181) Ke, Y.; Lindsay, S.; Chang, Y.; Liu, Y.; Yan, H. *Science* **2008**, *319*, 180.
- (182) Harbury, P. B.; Kim, P. S.; Alber, T. *Nature* **1994**, *371*, 80.
- (183) Harbury, P.; Zhang, T.; Kim, P.; Alber, T. *Science* **1993**, *262*, 1401.
- (184) Woolfson, D. N. In *Advances in Protein Chemistry*; Academic Press: 2005; Vol. 70, p 79.
- (185) Huang, P.-S.; Boyken, S. E.; Baker, D. *Nature* **2016**, *537*, 320.
- (186) Fletcher, J. M.; Harniman, R. L.; Barnes, F. R. H.; Boyle, A. L.; Collins, A.; Mantell, J.; Sharp, T. H.; Antognozzi, M.; Booth, P. J.; Linden, N.; Miles, M. J.; Sessions, R. B.; Verkade, P.; Woolfson, D. N. *Science* **2013**, *340*, 595.
- (187) Aupič, J.; Lapenta, F.; Strmšek, Ž.; Jerala, R. *Essays in Biochemistry* **2016**, *60*, 315.
- (188) Ambroggio, X. I.; Kuhlman, B. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 1154.
- (189) Hu, J.; O'Shea, E.; Kim, P.; Sauer, R. *Science* **1990**, *250*, 1400.
- (190) Lee, D. H.; Granja, J. R.; Martinez, J. A.; Severin, K.; Ghadiri, M. R. *Nature* **1996**, *382*, 525.
- (191) Araghi, R. R.; Koksche, B. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 3544.
- (192) Severin, K.; Lee, D. H.; Kennan, A. J.; Ghadiri, M. R. *Nature* **1997**, *389*, 706.
- (193) Giepmans, B. N. G.; Adams, S. R.; Ellisman, M. H.; Tsien, R. Y. *Science* **2006**, *312*, 217.
- (194) Yano, Y.; Yano, A.; Oishi, S.; Sugimoto, Y.; Tsujimoto, G.; Fujii, N.; Matsuzaki, K. *ACS Chemical Biology* **2008**, *3*, 341.
- (195) Reinhardt, U.; Lotze, J.; Mörl, K.; Beck-Sickinger, A. G.; Seitz, O. *Bioconjugate Chemistry* **2015**, *26*, 2106.
- (196) Reinhardt, U.; Lotze, J.; Zernia, S.; Mörl, K.; Beck-Sickinger, A. G.; Seitz, O. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 10237.
- (197) Sadhu, K. K.; Eierhoff, T.; Römer, W.; Winssinger, N. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 20013.
- (198) Brauckhoff, N.; Hahne, G.; Yeh, J. T.; Grossmann, T. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4337.
- (199) Jaegle, M.; Wong, E. L.; Tauber, C.; Nawrotsky, E.; Arkona, C.; Rademann, J. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 7358.
- (200) Lisurek, M.; Rupp, B.; Wichard, J.; Neuenschwander, M.; von Kries, J. P.; Frank, R.; Rademann, J.; Kühne, R. *Molecular Diversity* **2010**, *14*, 401.
- (201) Ramström, O.; Bunyapaiboonsri, T.; Lohmann, S.; Lehn, J.-M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2002**, *1572*, 178.
- (202) Burda, E.; Rademann, J. *Nature Communications* **2014**, *5*, 5170.
- (203) Berkovich-Berger, D.; Gabriel Lemcoff, N. *Chemical Communications* **2008**, 1686.
- (204) Sutton, L. R.; Donaubauer, W. A.; Hampel, F.; Hirsch, A. *Chemical Communications* **2004**, 1758.

- (205) Blanco-Canosa, J. B.; Medintz, I. L.; Farrell, D.; Mattoussi, H.; Dawson, P. E. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 10027.
- (206) Mondal, M.; Radeva, N.; Fanlo-Virgós, H.; Otto, S.; Klebe, G.; Hirsch, A. K. H. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 9422.
- (207) Parvatkar, P.; Kato, N.; Uesugi, M.; Sato, S.-i.; Ohkanda, J. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 15624.
- (208) Leung, I. K. H.; Brown Jr, T.; Schofield, C. J.; Claridge, T. D. W. *MedChemComm* **2011**, *2*, 390.
- (209) Black, S. P.; Sanders, J. K. M.; Stefankiewicz, A. R. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 1861.
- (210) Zhang, W.; Moore, J. S. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 11863.
- (211) Hunter, L.; Condie, G. C.; Harding, M. M. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 5064.
- (212) Vongvilai, P.; Angelin, M.; Larsson, R.; Ramström, O. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 948.
- (213) Nguyen, R.; Huc, I. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 1774.
- (214) Rijkers, D. T. S.; Merckx, R.; Yim, C.-B.; Brouwer, A. J.; Liskamp, R. M. J. *Journal of Peptide Science* **2010**, *16*, 1.
- (215) Sharpless, K. B.; Manetsch, R. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2006**, *1*, 525.
- (216) Maki, T.; Kawamura, A.; Kato, N.; Ohkanda, J. *Molecular BioSystems* **2013**, *9*, 940.
- (217) Jaegle, M.; Steinmetzer, T.; Rademann, J. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 3718.
- (218) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 6974.
- (219) Prescher, J. A.; Dube, D. H.; Bertozzi, C. R. *Nature* **2004**, *430*, 873.
- (220) Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *Nat Chem Biol* **2005**, *1*, 13.
- (221) Hamm, L. L.; Nakhoul, N.; Hering-Smith, K. S. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2015**, *10*, 2232.
- (222) Michael, A. *Journal für Praktische Chemie* **1893**, *48*, 94.
- (223) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie* **2002**, *114*, 2708.
- (224) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057.
- (225) Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. *Organic Letters* **2004**, *6*, 4603.
- (226) Zhou, Z.; Fahrni, C. J. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 8862.
- (227) Beatty, K. E.; Xie, F.; Wang, Q.; Tirrell, D. A. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 14150.
- (228) Beatty, K. E.; Liu, J. C.; Xie, F.; Dieterich, D. C.; Schuman, E. M.; Wang, Q.; Tirrell, D. A. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 7364.
- (229) Griffin, R. J. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Ellis, G. P., Luscombe, D. K., Eds.; Elsevier: 1994; Vol. 31, p 121.
- (230) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287*, 2007.
- (231) Staudinger, H.; Meyer, J. *Helvetica Chimica Acta* **1919**, *2*, 635.
- (232) Lemieux, G. A.; de Graffenried, C. L.; Bertozzi, C. R. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 4708.

- (233) Hangauer, M. J.; Bertozzi, C. R. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 2394.
- (234) Saxon, E.; Luchansky, S. J.; Hang, H. C.; Yu, C.; Lee, S. C.; Bertozzi, C. R. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 14893.
- (235) Dawson, P.; Muir, T.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. *Science* **1994**, *266*, 776.
- (236) Becker, C. F. W.; Hunter, C. L.; Seidel, R.; Kent, S. B. H.; Goody, R. S.; Engelhard, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 5075.
- (237) Bondalapati, S.; Jbara, M.; Brik, A. *Nature Chemistry* **2016**, *8*, 407.
- (238) Kulkarni, S. S.; Sayers, J.; Premdjee, B.; Payne, R. J. *Nature Reviews Chemistry* **2018**, *2*, 0122.
- (239) Watson, E. E.; Liu, X.; Thompson, R. E.; Ripoll-Rozada, J.; Wu, M.; Alwis, I.; Gori, A.; Loh, C.-T.; Parker, B. L.; Otting, G.; Jackson, S.; Pereira, P. J. B.; Payne, R. J. *ACS Central Science* **2018**, *4*, 468.
- (240) Zheng, J.-S.; Tang, S.; Qi, Y.-K.; Wang, Z.-P.; Liu, L. *Nature Protocols* **2013**, *8*, 2483.
- (241) Bang, D.; Chopra, N.; Kent, S. B. H. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 1377.
- (242) Muir, T. W.; Sondhi, D.; Cole, P. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 6705.
- (243) Xu, M. Q.; Perler, F. B. *EMBO J* **1996**, *15*, 5146.
- (244) Chong, S.; Mersha, F. B.; Comb, D. G.; Scott, M. E.; Landry, D.; Vence, L. M.; Perler, F. B.; Benner, J.; Kucera, R. B.; Hirvonen, C. A.; Pelletier, J. J.; Paulus, H.; Xu, M.-Q. *Gene* **1997**, *192*, 271.
- (245) Chong, S.; Shao, Y.; Paulus, H.; Benner, J.; Perler, F. B.; Xu, M.-Q. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 22159.
- (246) Scheibner, K. A.; Zhang, Z.; Cole, P. A. *Analytical Biochemistry* **2003**, *317*, 226.
- (247) Maag, D.; Lorsch, J. R. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *330*, 917.
- (248) Maag, D.; Fekete, C. A.; Gryczynski, Z.; Lorsch, J. R. *Molecular Cell* **2005**, *17*, 265.
- (249) Long, L.; Lin, W.; Chen, B.; Gao, W.; Yuan, L. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 893.
- (250) Yuan, L.; Lin, W.; Xie, Y.; Zhu, S.; Zhao, S. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 14520.
- (251) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 13518.
- (252) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 2297.
- (253) Gong, Y.-J.; Zhang, X.-B.; Zhang, C.-C.; Luo, A.-L.; Fu, T.; Tan, W.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 10777.
- (254) Wu, H.; Devaraj, N. K. *Accounts of Chemical Research* **2018**, *51*, 1249.
- (255) Silverman, A. P.; Kool, E. T. *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 3775.
- (256) Di Pisa, M.; Seitz, O. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 872.
- (257) Šečkutė, J.; Yang, J.; Devaraj, N. K. *Nucleic Acids Research* **2013**, *41*, e148.
- (258) Yang, J.; Šečkutė, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 7476.
- (259) Wittig, G.; Krebs, A. *Chemische Berichte* **1961**, *94*, 3260.
- (260) Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *Organic Letters* **2011**, *13*, 5937.
- (261) Friscourt, F.; Fahrni, C. J.; Boons, G.-J. *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21*, 13996.

- (262) Sanders, B. C.; Friscourt, F.; Ledin, P. A.; Mbua, N. E.; Arumugam, S.; Guo, J.; Boltje, T. J.; Popik, V. V.; Boons, G.-J. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 949.
- (263) Chen, X.; Henschke, L.; Wu, Q.; Muthoosamy, K.; Neumann, B.; Weil, T. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 353.
- (264) Staubitz, A.; Robertson, A. P. M.; Sloan, M. E.; Manners, I. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 4023.
- (265) Neises, B.; Steglich, W. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1978**, *17*, 522.
- (266) Thieriet, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibé, F.; Albericio, F. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 7275.
- (267) Lederberg, E. M.; Lederberg, J. *Genetics* **1953**, *38*, 51.
- (268) Jacob, F.; Monod, J. *Journal of Molecular Biology* **1961**, *3*, 318.
- (269) Rohs, R.; Jin, X.; West, S. M.; Joshi, R.; Honig, B.; Mann, R. S. *Annual Review of Biochemistry* **2010**, *79*, 233.
- (270) Luscombe, N. M.; Austin, S. E.; Berman, H. M.; Thornton, J. M. *Genome Biology* **2000**, *1*, reviews001.1.
- (271) Ellenberger, T. *Current Opinion in Structural Biology* **1994**, *4*, 12.
- (272) Chan, I. S.; Al-Sarraj, T.; Shahravan, S. H.; Fedorova, A. V.; Shin, J. A. *Biochemistry* **2012**, *51*, 6632.
- (273) Kohler, J. J.; Schepartz, A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 130.
- (274) Shea, E. K.; Rutkowski, R.; Stafford, W. F.; Kim, P. S. *Science* **1989**, *245*, 646.
- (275) John, M.; Leppik, R.; Busch, S. J.; Granger-Schnarr, M.; Schnarr, M. *Nucleic Acids Research* **1996**, *24*, 4487.
- (276) Tam, J. P.; Wong, T.-W.; Riemen, M. W.; Tjoeng, F.-S.; Merrifield, R. B. *Tetrahedron Letters* **1979**, *20*, 4033.
- (277) Pauling, L.; Corey, R. B.; Branson, H. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1951**, *37*, 205.
- (278) De Michele, C.; De Los Rios, P.; Foffi, G.; Piazza, F. *PLoS Comput Biol* **2016**, *12*, e1004752.
- (279) Liu, J.; Rost, B. *Protein Science* **2001**, *10*, 1970.
- (280) Bourchuladze, R.; Frenguelli, B.; Blendy, J.; Cioffi, D.; Schutz, G.; Silva, A. J. *Cell* **1994**, *79*, 59.
- (281) Wisdom, R.; Johnson, R. S.; Moore, C. *EMBO J* **1999**, *18*, 188.
- (282) Milde-Langosch, K. *European Journal of Cancer* **2005**, *41*, 2449.
- (283) Hess, J.; Angel, P.; Schorpp-Kistner, M. *Journal of Cell Science* **2004**, *117*, 5965.
- (284) Dong, G.; Medkova, M.; Novick, P.; Reinisch, K. M. *Molecular Cell* **2007**, *25*, 455.
- (285) Surkont, J.; Diekmann, Y.; Ryder, P. V.; Pereira-Leal, J. B. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2015**, *83*, 2162.
- (286) Engel, A. M.; Cejka, Z.; Lupas, A.; Lottspeich, F.; Baumeister, W. *EMBO J* **1992**, *11*, 4369.
- (287) Kilmartin, J. V.; Dyos, S. L.; Kershaw, D.; Finch, J. T. *J Cell Biol* **1993**, *123*, 1175.
- (288) Lupas, A.; Müller, S.; Goldie, K.; Engel, A. M.; Engel, A.; Baumeister, W. *Journal of Molecular Biology* **1995**, *248*, 180.
- (289) Wei, R. R.; Sorger, P. K.; Harrison, S. C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 5363.

- (290) Ciferri, C.; Pasqualato, S.; Screpanti, E.; Varetti, G.; Santaguida, S.; Dos Reis, G.; Maiolica, A.; Polka, J.; De Luca, J. G.; De Wulf, P.; Salek, M.; Rappsilber, J.; Moores, C. A.; Salmon, E. D.; Musacchio, A. *Cell* **2008**, *133*, 427.
- (291) Aravamudhan, P.; Goldfarb, A. A.; Joglekar, A. P. *Nat Cell Biol* **2015**, *17*, 868.
- (292) Hiruma, Y.; Sacristan, C.; Pachis, S. T.; Adamopoulos, A.; Kuijt, T.; Ubbink, M.; von Castelmur, E.; Perrakis, A.; Kops, G. J. P. L. *Science* **2015**, *348*, 1264.
- (293) Ji, Z.; Gao, H.; Yu, H. *Science* **2015**, *348*, 1260.
- (294) Carter, A. P.; Diamant, A. G.; Urnavicius, L. *Current Opinion in Structural Biology* **2016**, *37*, 62.
- (295) Kull, F. J.; Sablin, E. P.; Lau, R.; Fletterick, R. J.; Vale, R. D. *Nature* **1996**, *380*, 550.
- (296) Kaan, H. Y. K.; Hackney, D. D.; Kozielski, F. *Science (New York, N.Y.)* **2011**, *333*, 883.
- (297) Gigant, B.; Wang, W.; Dreier, B.; Jiang, Q.; Pecqueur, L.; Plückthun, A.; Wang, C.; Knossow, M. *Nature Structural & Molecular Biology* **2013**, *20*, 1001.
- (298) Kerssemakers, J.; Howard, J.; Hess, H.; Diez, S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 15812.
- (299) Asbury, C. L.; Fehr, A. N.; Block, S. M. *Science (New York, N.Y.)* **2003**, *302*, 2130.
- (300) Fehr, A. N.; Gutiérrez-Medina, B.; Asbury, C. L.; Block, S. M. *Biophys J* **2009**, *97*, 1663.
- (301) Schmidt, H.; Zalyte, R.; Urnavicius, L.; Carter, A. P. *Nature* **2015**, *518*, 435.
- (302) Bhabha, G.; Cheng, H.-C.; Zhang, N.; Moeller, A.; Liao, M.; Speir, J. A.; Cheng, Y.; Vale, R. D. *Cell* **2014**, *159*, 857.
- (303) Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. *Organic Letters* **2007**, *9*, 3797.

9 DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Seitz für die Möglichkeit bedanken, meine Arbeiten zur Promotion in seinem Arbeitskreis durchführen zu dürfen. Ich bedanke mich für das interessante Thema, sowie für die Unterstützung, die ich durch seinen wissenschaftlichen Rat erfahren durfte.

Ich bedanke mich bei Dr. Ramon Sobiros Funosas, der mich bei der Durchführung der Arbeiten in Abschnitt 4.1 unterstützt hat. Die Auszubildenden Anne Mohr, Lukas Pauldar, Michelle Matschke und Jasmin Kutz waren mir eine große Hilfe bei der praktischen Laborarbeit. Ich bedanke mich bei Kira Tikhonov für ihre Unterstützung und die Erstellung ihrer Bachelorarbeit unter meiner Betreuung

Ich bedanke mich beim gesamten Arbeitskreis Seitz für die schöne gemeinsame Zeit. Ganz besonders möchte ich mich meinen Laborkollegen und Laborkolleginnen aus meinem Labor 2'112 bedanken. Ohne Jun. Prof. Dr. Olalla Vasquez, Dr. Jasmine Chamiolo, Dr. Ulrike Reinhardt, Dr. Robert Zitterbart und Olaf Fuchs wäre meine Zeit im Labor nicht die selbe gewesen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die zu jedem Zeitpunkt meines Studiums und meiner Promotion ausnahmslos unterstützt haben. Der aller größte Dank gilt meiner Ehefrau Dr. Natali Dubel, die mich nicht nur bei der Durchsicht und der Korrektur dieser Arbeit unterstützt hat, sondern mir immer motivierend zur Seite stand und mir Halt gegeben hat.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 42/2018 am 11.07.2018 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Datum, Unterschrift